

Comparação dos parâmetros cinéticos da xantina desidrogenase em neoplasia experimental

OTTILIA R. AFFONSO^{1, 2}, ARTHUR S. R. SOUZA¹, EMILIO MITIDIERI¹

Trabalho realizado no Instituto Nacional de Câncer - Rio de Janeiro, RJ, com auxílio do CNPq

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi o de comparar os parâmetros cinéticos da xantina desidrogenase (XD) do soro de ratos normais e de ratos portadores de sarcoma induzido por 20-metilcolantreno. Foi verificado que a XD decresce no soro dos animais portadores. A afinidade da XD para com a xantina foi semelhante no soro normal e no soro de animais com sarcoma. A inativação a 70° C é, aparentemente, de primeira ordem em relação à concentração de enzima. A atividade XD foi linear durante 60 minutos de incubação e a enzima do soro de animais com sarcoma foi mais sensível à ação de diferentes inibidores. Concluiu-se não haver diferença significativa na estrutura de ambas as XD e que o decréscimo da atividade XD no soro de portadores de câncer indica uma baixa na concentração de enzima no soro sanguíneo.

Unitermos: xantina; desidrogenase; sarcoma; 20-metilcolantreno

Introdução

Xantina desidrogenase (XD) (E.C. 1.2.1.37) é uma enzima do catabolismo das purinas e responsável pela conversão da hipoxantina em xantina e da xantina em ácido úrico. A XD pode ser convertida *in vitro* em xantina oxidase (XO), por vários tratamentos como proteólise, aquecimento e tratamento com reagentes modificadores de sulfidril [1, 2]. Foi demonstrado que essa conversão também ocorre *in vivo*. Interferons [3] e etanol [4] elevam a XO de coração de ratos devido à conversão de XD em XO. O sistema xantina-xantina oxidase é gerador de radical superóxido O₂⁻, que pode reagir de inúmeras formas, conduzindo a intermediários tóxicos para as células.

A XO do fígado está ausente no hepatoma de Novikoff transplantado [5] e aparece diminuída no hepatoma induzido por corantes azo [6]. Decréscimos semelhantes foram verificados na XO do fígado sob efeitos de p-dimetilaminoazo benzeno e em vários hepatomas examinados [7]. Por outro lado, a diminuição na atividade da enzima do fígado produzida por baixa alimentação de proteína ou por ingestão de azo corantes não é acompanhada por decréscimo na

excreção de ácido úrico e alantoina [8]. Comparando-se a atividade da XO de fígado normal com a XO de hepatomas comprovou-se que a afinidade da enzima para a xantina foi semelhante no fígado normal e nos hepatomas examinados [9]. Verificou-se ainda o efeito inibidor do acetato de cobre sobre a atividade da XD na carcinogênese hepática por D-L-etionina [10, 11].

O fígado não tem sido, no entanto, o único órgão cujas atividades XD e XO têm sido determinadas em neoplasias experimentais. Na pele, por exemplo, verificou-se um aumento da XO, após 48-96 horas de aplicação de 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e esse aumento foi devido a uma estimulação, TPA-dependente, da síntese de XD e da conversão de XD em XO [12]. Verificou-se também a indução da formação de tumores no intestino de ratos após aplicações semanais de 1-2-dimetilidrazina (DMH), durante 20 semanas, mostrou uma diminuição da atividade XD, exatamente na porção onde ocorre maior incidência tumoral [3, 14].

Os efeitos de neoplasias diversas sobre as enzimas XD e XO de soro sanguíneo de ratos têm sido, no entanto, pouco estudados. Um decréscimo na atividade de XD do soro sanguíneo foi por nós observado

¹Pesquisadores do Centro de Pesquisa Básica do Instituto Nacional de Câncer - Endereço do autor para correspondência: Praça Cruz Vermelha, 23 - CEP 20230 - Rio de Janeiro - RJ

em diferentes tipos de câncer, sem ocorrência de variação do nível de proteína plasmática, sugerindo que esta diminuição da atividade enzimática no soro deve ser devida a fatores não correlacionados à deficiência protéica ocasionada pela inanição animal [15].

Esses estudos mostraram que as atividades XD e XO são variáveis em diferentes tipos de neoplasias, mas não se conhece a ocorrência de qualquer relação entre essa variação e qualquer mudança na estrutura da enzima. Neste trabalho, nós descrevemos um estudo cinético em câncer experimental (sarcoma) das enzimas com atividades XD e XO, mostrando que as variações enzimáticas que ocorrem no sangue são conseqüentes de alterações na concentração da enzima no soro.

Material e Métodos

Animais: Ratos R, machos, da colônia do Instituto Nacional de Câncer, pesando 180-200 g e mantidos em gaiolas, em ambiente com temperatura constante (25°C), foram usados nestas experiências. Os ratos foram mantidos em dieta própria para animais de laboratório, por um ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Comida e água foram administradas *ad libitum*. Os animais foram sempre sangrados entre as 14 e 15 horas. O sangue foi retirado dos animais anestesiados com éter, por punção cardíaca. O soro sanguíneo foi separado e usado imediatamente na dosagem da atividade enzimática [16, 17].

Reagentes: Os produtos químicos utilizados neste trabalho foram: xantina, nitro blue tetrazol (NBT), iodonitro tetrazol (INT), fenazina metossulfato (PMS), NADH, reagente de Folin-fenol e soro albumina bovina, todos originários de Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. Gelatina e EDTA foram obtidos de E. Merck AG Darmstadt. Todos os reagentes usados foram de grau analítico.

Indução tumoral: Um sarcoma originalmente induzido por 20-metilcolantreno foi mantido seqüencialmente em ratos R, machos, pela implantação dorsal de fragmentos de 300 mg de tecido tumoral, conforme descrito anteriormente [15]. O tumor apresentou-se durante nossas experiências, entre a 52.^a e a 57.^a geração de transplante. A média de tempo de sobrevivência dos ratos portadores de tumores foi de 41,08 ± 4,27 dias (média ± D.P., n = 12). Os animais portadores de sarcoma foram sangrados para a determinação da atividade XD 30 dias após o transplante da massa tumoral.

Determinação da atividade XD: A atividade XD foi avaliada espectrofotometricamente usando NBT

como receptor de elétrons e xantina como substrato, segundo Fried [18]. Um volume de 0,1 ml de soro sanguíneo foi diluído com uma solução-tampão de pirofosfato 0,015 M de pH 8,6. A mistura final para incubação continha a seguinte composição: NBT 1 mg; xantina 0,3 mmol; EDTA 0,1 mmol; 0,2 ml de gelatina 0,1%; PMS 0,01% e tampão pirofosfato 0,015 M até completar 3,5 ml. Os reagentes foram misturados em temperatura ambiente e colocados em banho-maria a 37°C. O PMS foi adicionado cinco minutos após o começo da incubação e a reação foi iniciada pela adição da solução de enzima (0,1 ml de soro sanguíneo). A mistura foi mantida a 37°C, por cinco minutos, e a reação interrompida pela adição de 0,5 ml de HCl 0,35 M. A cor foi lida em 540 nm, em espectrofotômetro Perkin-Elmer Coleman 55.

Expressão dos resultados: A atividade XD foi calculada utilizando uma curva padrão estabelecida pela redução do NBT não enzimaticamente com NADH, de acordo com Nachlas et al. [19]. A atividade foi expressa em mmol de NADH x h⁻¹ x mg proteína⁻¹. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste-t.

Purificação da XD: A enzima do soro sanguíneo foi purificada usando-se a precipitação fracionada pelo sulfato de amônio, conforme método previamente usado [20, 21] e com mesmo tratamento para purificação da enzima encontrada na fração solúvel do fígado, aquela que contém praticamente 100% da atividade XD [22]. Todas as etapas de purificação foram conduzidas entre 0 e 4°C. A enzima foi, primeiramente, precipitada em 30-32% de saturação de sulfato de amônio e, posteriormente, em 54% de saturação, por adição, gota a gota, de uma solução saturada de (NH₄)₂SO₄. Após diálise, por 22 horas, a solução de enzima foi tratada com n-butanol (1:1) centrifugada a 1.000 x g por 15 minutos e o sobrenadante usado como enzima purificada.

Eletroforese em gel de poliacrilamida: Foi realizada em colunas de 75 x 5 mm, numa câmara vertical SAE-2734 (Shandon apparatus-London) de acordo com o processo descrito por Affonso et al. [23], com modificações do método elaborado por Narayan et al. [24]. A eletroforese foi conduzida em gel 7,5% a 25°C, com corrente de 2,5 mA por tubo. Para revelação e localização da atividade XD, o gel foi imerso em uma solução contendo 5 ml de tampão pirofosfato 0,015 M e pH 8,6, 0,1 ml de solução de hipoxantina 0,05 M e 0,4 ml de uma solução de iodonitro tetrazol (INT) 0,5%. Após duas horas de incubação a 37°C, no escuro, o gel foi transferido para uma solução de ácido acético, aparecendo a atividade enzimática no gel, na forma de uma banda vermelho-violeta.

Determinação da proteína: A dosagem da proteína no soro foi realizada com o emprego do método descrito por Lowry et al. [25] que usa o reagente de Folin-fenol. Foi usada a albumina de soro bovino como referência.

Resultados

Os parâmetros cinéticos da XD foram determinados no soro sangüíneo de ratos normais e comparados com os da enzima do soro de animais portadores de sarcoma. Em soro de ratos com sarcoma foi encontrado um decréscimo marcante na atividade XD. Os resultados obtidos mostraram uma atividade XD de $(60,0 \pm 9,8) \times 10^{-3}$ mmol NADH \times h⁻¹ \times mg proteína⁻¹ para 11 ratos normais e de $(34,6 \pm 6,2) \times 10^{-3}$ mmol NADH \times h⁻¹ \times mg proteína⁻¹ para 12 animais portadores de câncer. Essa diferença é estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

Efeito da concentração de xantina: O efeito da concentração de substrato sobre a atividade XD em soro de ratos normais e de ratos com sarcoma é visto na Figura 1 e mostra que em ambas as enzimas a atividade XD foi saturada numa concentração aproximada de 1,0 mmol de xantina, quando parece iniciarse leve efeito inibidor pelo substrato. A afinidade da XD para com a xantina foi semelhante tanto para a enzima de soro de ratos normais como para a de soro de portadores. O Km foi determinando segundo Lineweaver-Burk [26], encontrando-se valores de Km = 1 a 2,5 mM.

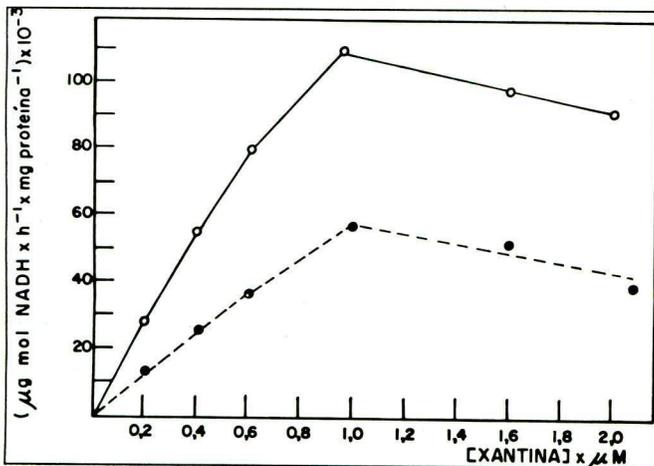


Figura 1. Comparação do efeito da concentração de xantina sobre a atividade de xantina desidrogenase (XD) no soro normal (—) e soro de portadores de sarcoma (---). As determinações foram conduzidas como descrito em *Materiais e Métodos*, variando somente a concentração de substrato. Experiências foram realizadas em triplicata.

Efeito do pH: Tanto a enzima do soro de ratos normais como a XD de soro de ratos cancerosos apre-

sentaram um pH ótimo em torno de 8,6 (Figura 2). O efeito do pH foi testado em condições idênticas em ambas XD, usando tampão pirofosfato entre pH 6,0 e 10,0.

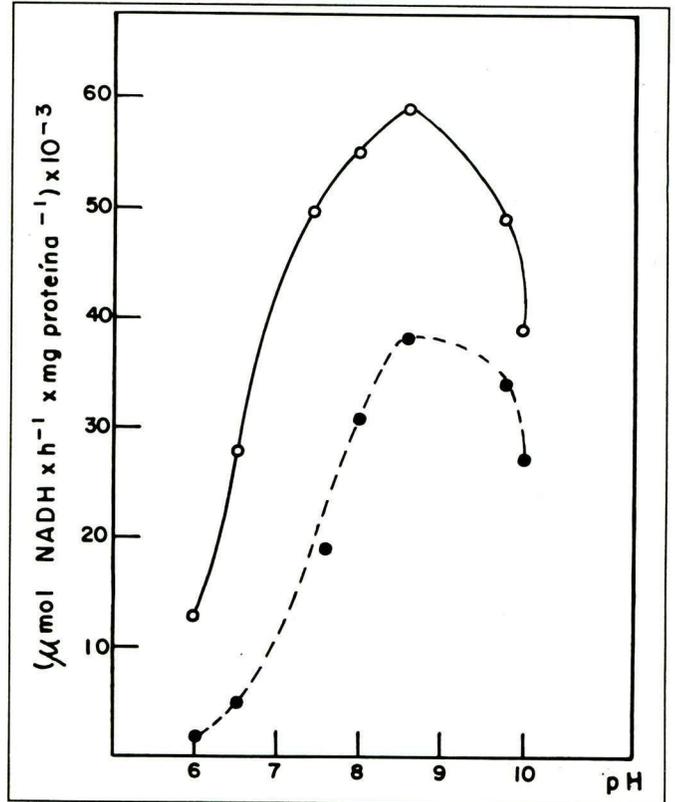


Figura 2. Comparação do efeito pH sobre a atividade de XD do soro de animais portadores de sarcoma (linha tracejada) e de soro de animais normais (linha cheia). As dosagens foram conduzidas como descrito em *Materiais e Métodos*, variando o pH da mistura reagente. Tampão pirofosfato foi usado do pH 6,0 ao 10,0, sendo indicado na figura o pH final da mistura reagente.

Comparação da atividade XD com o tempo de incubação e com a quantidade de enzima adicionada: A atividade nos dois sistemas apresentou-se de forma linear, durante 60 minutos de incubação a 37°C (Figura 3), sendo que a enzima do soro de ratos portadores foi menos ativa numa mesma concentração de proteína e em diferentes tempos de incubação, até 60 minutos. A linearidade está também relacionada com a quantidade de proteína adicionada, nas concentrações de 5 a 20 mg (Figura 4) e com a quantidade de enzima adicionada. Com relação à quantidade de enzima adicionada ao sistema, a XD de soro de ratos portadores mostrou-se menos ativa que a do soro de ratos normais nos mesmos níveis de adição de proteína.

Espectro de absorção: A Figura 5 mostra o espectro de absorção no visível e no ultravioleta das enzimas purificadas a partir de soro fisiológico de ratos

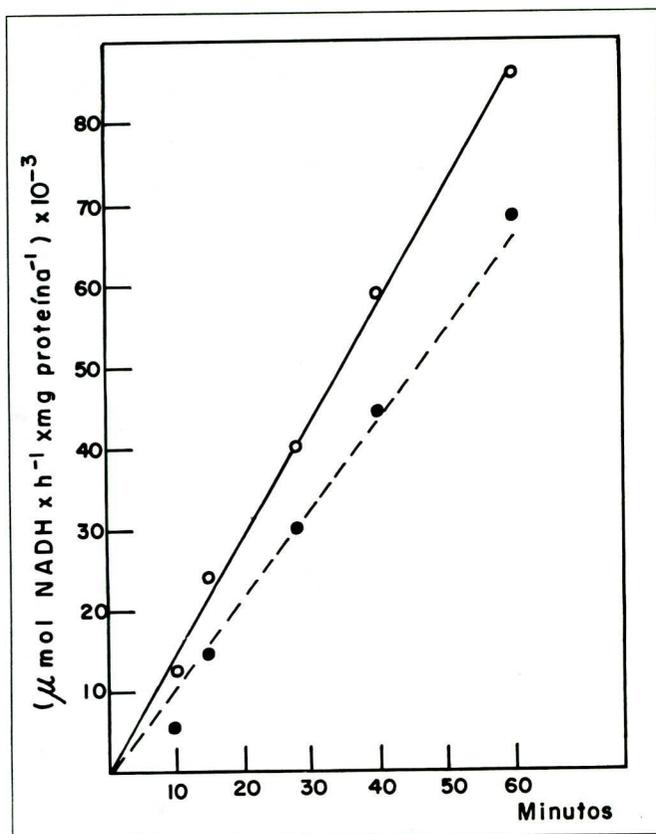


Figura 3. Proporcionalidade da atividade XD com o tempo de incubação do soro de animais normais (—) e do soro de animais com sarcoma (---). As dosagens, variando o tempo de incubação, foram conduzidas como descrito no texto.

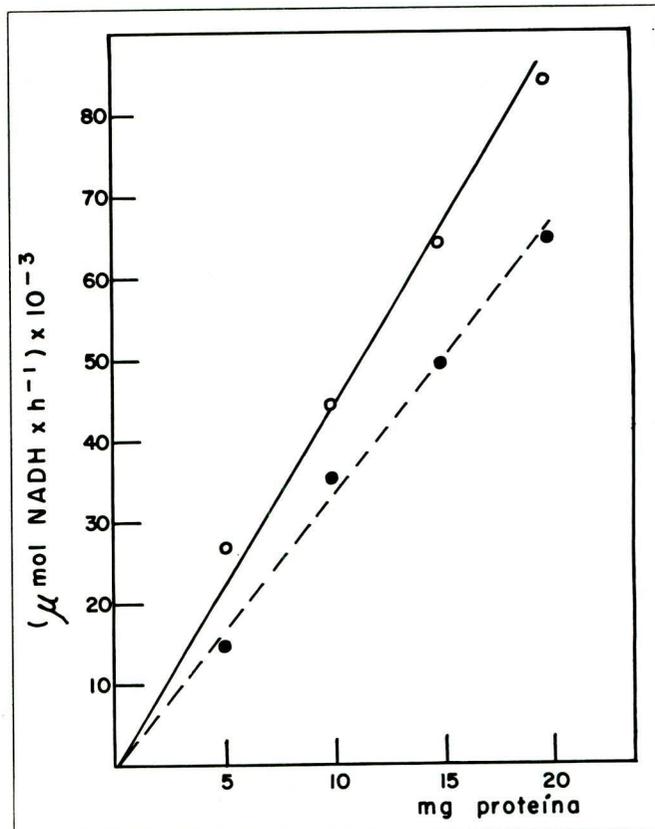


Figura 4. Proporcionalidade da atividade XD com a quantidade de proteína adicionada do soro normal (—) ou com sarcoma (---). Foi usado o processo descrito em *Materiais e Métodos*, variando somente a quantidade de soro adicionada.

normais e de ratos portadores de sarcoma. Em ambas as enzimas é visto um aumento contínuo da absorção na faixa de 400 a 450 nm, destacando-se um pico, cujo máximo está localizado em 450 nm, característico da presença de riboflavina na forma de FAD. Os dois espectros são bastante semelhantes entre si, indicando não haver grandes diferenças entre as estruturas de ambas as enzimas e se assemelham com o espectro de absorção da enzima do fígado [27-29], do leite [30, 31] e do soro de boi [32, 33].

Estabilidade da enzima e sensibilidade a inibidores: A solução de enzima purificada quando resfriada ou congelada ficou relativamente estável. Observou-se um certo aumento da atividade específica das enzimas de soro normal e de soro de portadores, após os primeiros dias de armazenamento no frio. A Figura 6 mostra a estabilidade da enzima em temperaturas de 60 a 70°C. Verificou-se que ocorre uma inativação, aparentemente, de primeira ordem em relação à concentração enzimática. As meias-vidas correspondentes das enzimas foram determinadas pelo emprego de gráfico de log da atividade remanescente vs. o tempo de incubação, numa certa temperatura (70°C). Os

valores para as meias-vidas, em 70°C, foram de dois e três minutos para o soro dos animais portadores e para o soro de ratos normais, respectivamente. Os valores absolutos para as meias-vidas das duas enzimas não têm praticamente diferenças, o que indica não haver substancial diferença na estrutura da XD de soro normal e da XD de soro de portadores de câncer.

A enzima de soro de ratos portadores de sarcoma mostrou-se mais sensível aos inibidores comuns da XD do que a enzima de soro de ratos normais (Tabela 1). Alopurinol, p-hidroxi mercuribenzoato, o-iodoso benzoato e 6-pteridilaldeído mostraram-se como potentes inibidores tanto para a enzima de soro de animais normais como para a enzima de ratos portadores.

Eletroforese: As duas enzimas apresentaram atividade de XD com a mesma mobilidade quando se faz a eletroforese em gel de policrilamida. Tanto a enzima bruta de soro de ratos normais como a de soro de ratos portadores, quando comparadas com as enzimas purificadas, apresentaram uma única banda corada pelo INT, mostrando mobilidades iguais. A revelação

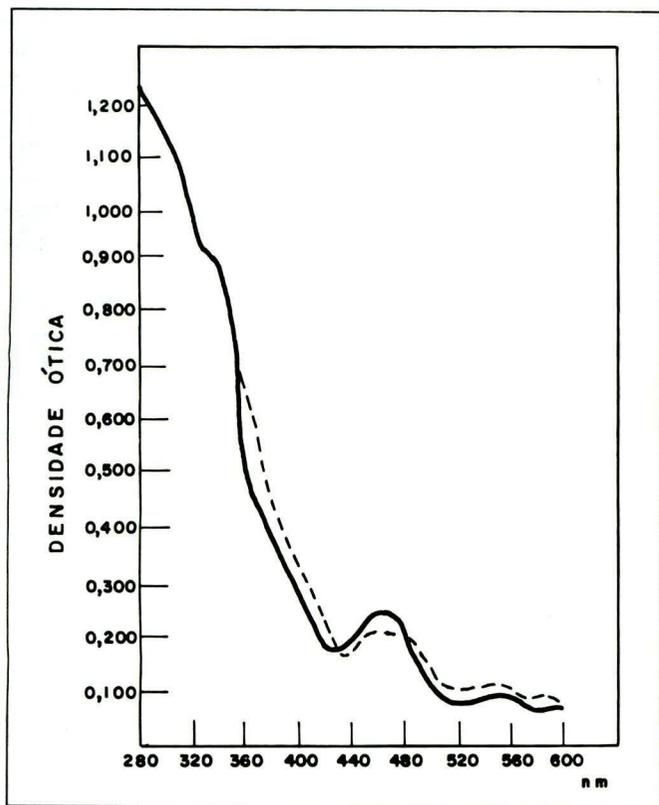


Figura 5. Curva de absorção da xantina desidrogenase purificada de soro de animais normais (linha cheia) e de soro de animais portadores de câncer (linha interrompida). Ambas foram examinadas diluídas em tampão pirofosfato 0,015 M de pH 8,6.

da proteína nas duas enzimas purificadas mostrou uma banda maior, mais espalhada, com uma mobilidade semelhante à daquela revelada para a atividade XD.

Discussão

Foi feita a comparação dos parâmetros cinéticos da XD do soro sanguíneo de ratos R normais com os

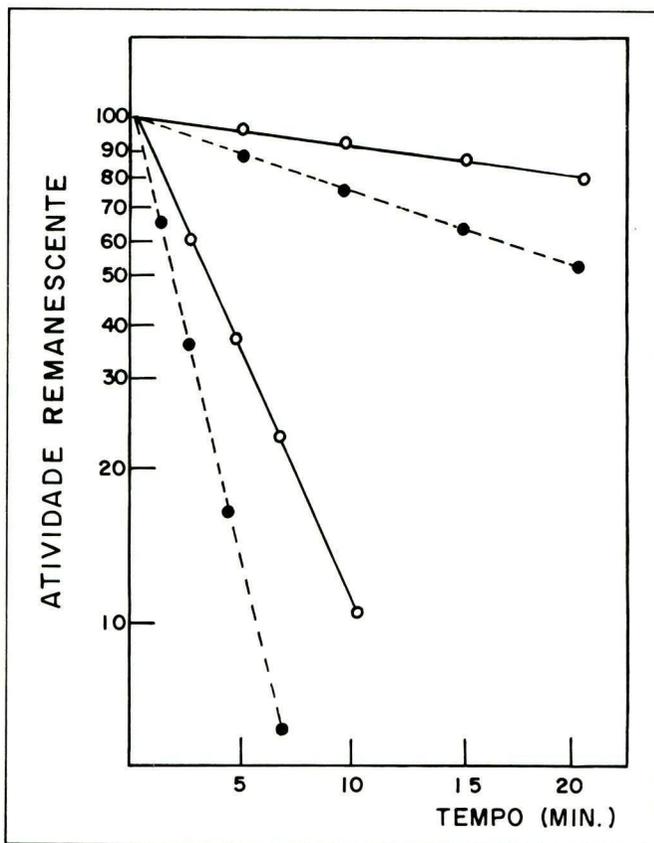


Figura 6. Estabilidade térmica da xantina desidrogenase do soro de ratos normais (linha cheia) e de ratos com sarcoma (linha tracejada). O soro foi incubado em diferentes temperaturas. Aliquotas de 0,1 ml de soro foram retiradas e dosadas quanto à sua atividade residual, em intervalos de tempos diferentes. As meias-vidas foram determinadas pelo gráfico do semi-log da atividade residual vs. o tempo.

da enzima do soro de ratos R portadores de sarcoma. A dosagem da atividade da enzima no 30.º dia de transplante do sarcoma induzido por 20-metilcolantreno mostrou um decréscimo da atividade de XD nos ratos portadores. Outras alterações descritas na ativi-

Tabela 1. Inibição da atividade XD do soro de animais normais e do soro de animais portadores de sarcoma.

Inibidor final	Concentração Normal	% Inibição*	
		Normal	Sarcoma
Alopurinol	2,6 x 10 ⁻⁵ M	50,23 ± 4,48	63,84 ± 9,19
p-Hidroximercuribenzoato	5,0 x 10 ⁻⁵ M	100,00	100,00
Aminopterina	2,0 x 10 ⁻⁵ M	78,00 ± 1,44	80,00 ± 2,83
8-Azaguanina	2,0 x 10 ⁻⁵ M	49,73 ± 7,07	59,38 ± 4,31
o-Iodosobenzoato	2,0 x 10 ⁻⁵ M	92,50 ± 0,28	93,34 ± 0,42
6-Pteridilaldeído	0,045 mg/ml	95,03 ± 2,83	100,00
2-Amino-4-hidroxi pteridina	2,0 x 10 ⁻⁵ M	21,46 ± 4,24	31,49 ± 5,49
6-Mercaptopurina	0,04 mg/ml	4,21 ± 0,17	17,49 ± 3,14

*Os valores representam média ± D.P. de determinações em duplicata de amostras de soro obtidas de um mínimo de quatro ratos.

dade da enzima do fígado e do soro sangüíneo em diferentes condições experimentais [34, 41] têm sido explicadas como sendo devidas à dissociação do complexo enzima-lipídio, tornando a enzima livre mais vulnerável à ação de drogas diversas. As ações *in vivo* e *in vitro* com diferentes produtos indicam que a dissociação deste complexo aumenta a atividade da enzima, permitindo uma inibição mais efetiva. No presente trabalho a inibição poderia ser explicada, em parte, devido à dissociação do complexo, pois, aparentemente, os parâmetros cinéticos não apresentaram diferenças. Assim, foi obtido praticamente o mesmo Km para as enzimas do soro de animais normais e de animais portadores, na mesma ordem de grandeza do Km para a enzima do fígado normal e de hepatomas [9].

Ambas as enzimas apresentaram-se no soro com o mesmo pH ótimo (8,6), exibindo atividade em pH 6,0 e pH 10,0. Desde que os parâmetros cinéticos de ambas as enzimas são aparentemente semelhantes, parece não haver evidências da presença de isoenzimas nos ratos portadores, como já havíamos descrito anteriormente no soro sangüíneo de ratos normais [23]. Os resultados da eletroforese em gel de poli-acrilamida com ambos os soros mostraram, claramente, a confirmação da ausência de isoenzimas também no soro sangüíneo de ratos portadores de sarcoma. Por outro lado, como nos dois sistemas analisados, a atividade da enzima foi estritamente proporcional à quantidade de enzima adicionada, as alterações observadas na atividade enzimática devem refletir variações nas concentrações de enzima no soro, como parece ocorrer na carcinogênese do intestino induzida por 1-2-dimetilhidrazina [13, 14].

Amostras congeladas da enzima purificada, provenientes dos dois sistemas analisados mostraram-se bastante estáveis. Houve um aumento da atividade específica durante os primeiros dias de armazenamento no frio, provavelmente devido ao efeito de mudanças conformacionais da molécula da enzima [12]. Por outro lado, aparentemente, são iguais os valores das meias-vidas das enzimas do soro a 70°C, mostrando que os dois sistemas apresentam as mesmas mudanças com relação a altas e baixas temperaturas.

Diversos inibidores da atividade XD foram usados para testar a sensibilidade da enzima do soro de portadores de sarcoma comparando-a com a atividade XD de soro de animais normais. Todos os inibidores testados mostraram que a enzima de soro de animais com câncer é mais sensível aos diversos inibidores, o que poderia sugerir uma dissociação do complexo lipídio-enzima, colocando a enzima mais vulnerável, permitindo uma inibição mais efetiva da atividade XD.

O aumento da atividade XO devido à conversão de XD em XO e que está associado com diversas condi-

ções patológicas, incluindo a isquemia intestinal [42], o acréscimo na atividade da enzima do coração em animais tratados cronicamente com etanol [4, 43] e a toxicidade hepática [4], sugere que, nestes casos, a XO é o fator responsável pela toxicidade [12]. Nossos estudos parecem indicar não haver propriamente diferença estrutural entre a enzima do soro de ratos portadores de sarcoma e a enzima de soro de ratos normais [44]. Nossas pesquisas futuras serão dirigidas no sentido de se evidenciar o quanto a transformação de XD em XO está associada com a promoção das alterações cinéticas induzidas pelo 20-metilcolantreno.

Summary

The behaviour of xanthine dehydrogenase (XD) was examined in normal serum and in the serum of rats with sarcoma. XD decreased in the serum of tumour bearing host. The affinity of XD to xanthine was similar in normal serum and in serum of tumour bearing rats. Inactivation at 70°C is apparently first order with respect to enzyme concentration. XD activity was linear during 60 min incubation and the tumour serum enzyme was more sensitive to different inhibitors. We conclude that there are not substantial differences in the structures in both XD and it is assumed that the decreased XD activity in the sarcoma neoplasms indicated lowered enzyme concentration.

Key Words: xanthine dehydrogenase in experimental cancer

Referências bibliográficas

1. DELLA CORTE E, STIRPE F. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme. *Biochem J* 1972; 126: 739-745.
2. STIRPE F, DELLA CORTE E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion *in vitro* of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 1969; 244: 3855-3863.
3. GHEZZI P, BIANCHI M, GIANERO L, LANDOLFO S, SALMONA M. Role of reactive oxygen intermediates in the interferon-mediated depression of hepatic drug metabolism and protective effects of N-acetylcysteine in mice. *Cancer Res* 1985; 45: 3444-3447.
4. OEI HH, ZOGANAS HC, MCCORD JM, SCHAFFER SW. Role of acetaldehyde and xanthine oxidase in ethanol-induced oxidative stress. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1986; 51: 195-203.
5. DE LAMIRANDE G, ALLARDE C. Purine-metabolizing enzymes in normal and neoplastic rat liver. Studies on 5'-nucleotidase and adenosine deaminase. *Proc Am Assoc Can Res* 1957; 2: 224.
6. REID E, LEWIN I. Adenosine deaminase, nucleoside phosphorilase and xanthine oxidase in liver tumours. *British J Can* 1957; 11: 494-498.
7. WESTERFELD WW, RICHERT DA, HILFINGER MF. Studies on

- xanthine oxidase during carcinogenesis by p-dimethylaminoazo-benzene. *Cancer Res* 1950; 10: 486-484.
8. BASS AD, TEPPERMAN J, RICHERT DA, WESTERFELD WW. Excretion of uric acid and allantoin by rats depleted of liver xanthine oxidase. *Proc Soc Exptl Biol Med* 1950; 73: 687-689.
 9. PRAJDA N, MORRIS HP, WEBER G. Imbalance of purine metabolism in hepatomas of different growth rate as expressed in behavior of xanthine oxidase. *Cancer Res* 1976; 36: 4639-4646.
 10. AFFONSO OR, SOUZA ASR, MITIDIERI E. Ação de sais de cobre sobre a xantina desidrogenase na carcinogênese hepática de ratas. *Rev Bras Cancerol* 1984; 30: 7-11.
 11. AFFONSO OR, SOUZA ASR, MITIDIERI E. Effect of copper on blood serum xanthine dehydrogenase in rats given D-L-ethionine. *Arch Geschwulstforschung* 1985; 55: 167-170.
 12. REINERS JJ, PENCE BC, BARCUS MCS, CANTU AR. 12-o-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-dependent induction of xanthine dehydrogenase and conversion to xanthine oxidase in murine epidermis. *Cancer Res* 1987; 47: 1775-1779.
 13. AFFONSO OR, SOUZA ASR, ASCH KH, MITIDIERI E. Atividade de xantina oxidase na carcinogênese induzida pela 1-2-dimetilidrazina. *Rev Bras Cancerol* 1987; 33: 29-31.
 14. MITIDIERI E, SOUZA ASR, AFFONSO OR. Xanthine oxidase activity in intestinal tumors induced by 1-2-dimethylhydrazine dihydrochloride. *Arch Geschwulstforschung* 1988; 58: 79-80.
 15. AFFONSO OR, AYRES DE MOURA CV, CAVALLARI V, MITIDIERI E. Serum and liver xanthine oxidase activity in tumor bearing rats and mice. *An Acad Bras Cienc* 1981; 53: 617-620.
 16. MITIDIERI E, AFFONSO OR, SCHETTINO CM, RIBEIRO LP. A study of the effects of dietary lipids upon xanthine dehydrogenase activity. *An Acad Brasil Cienc* 1970; 42: 633-636.
 17. MITIDIERI E, AFFONSO OR, RIBEIRO LP. Xanthine dehydrogenase activity in starved-refed rats treated with 8-azaguanine. *Acta Biol Med Germ* 1974; 32: 695-699.
 18. FRIED R. Colorimetric determination of xanthine dehydrogenase by tetrazolium reduction. *Anal Biochem* 1966; 16: 427-432.
 19. NACHLAS MM, MARGULIES SI, SELIGMAN AM. A colorimetric method for the estimation of succinic dehydrogenase activity. *J Biol Chem* 1960; 235: 499-503.
 20. MITIDIERI E, AFFONSO OR, RIBEIRO LP. Studies on the phosphate requirement for xanthine dehydrogenase activity. I: Phosphorus content and activity of different enzyme preparations. *Rev Bras Biol* 1969; 29: 391-397.
 21. MITIDIERI E, AFFONSO OR, RIBEIRO LP. Role of phospholipids in xanthine dehydrogenase activity. *Enzymologia* 1970; 38: 161-167.
 22. VILLELA GG, MITIDIERI E, AFFONSO OR. Intracellular distribution of xanthine oxidase in rat liver. *Nature* 1955; 175: 1087.
 23. AFFONSO OR, LEMOS MF, SIMAS SM, MITIDIERI E. Characterization of the blood serum xanthine dehydrogenase by polyacrilamide-gel electrophoresis. *An Acad Bras Cienc* 1975; 47: 517-520.
 24. NARAYAN KA, NARAYAN S, KUMMEROW FA. A modified disc electrophoretic method for animal blood serum proteins. *J Chromatography* 1964; 16: 187-193.
 25. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
 26. LINEWEAVER H, BURK D. The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc* 1934; 56: 658-666.
 27. KIELLY KR. Purification of liver xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1955; 216: 405-412.
 28. REMY CN, RICHERT DA, DOISY RJ, WELLS IC, WESTERFELD WW. Purification and characterization of chicken liver xanthine dehydrogenase. *J Biol Chem* 1955; 217: 293-305.
 29. BRUMBY PE, MILLER RW, MASSEY V. The content and possible catalytic significance of labile sulfide in some metalloflavoproteins. *J Biol Chem* 1965; 240: 2222-2228.
 30. RICHERT DA, WESTERFELD WW. The relationship of iron to xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1954; 209: 179-189.
 31. HART LI, MCGARTOLL MA, CHAPMAN HR, BRAY RC. The composition of milk xanthine oxidase. *Biochem J* 1970; 116: 851-864.
 32. VILLELA GG, AFFONSO OR, MITIDIERI E. Xanthine dehydrogenase in bovine blood serum. *Experientia* 1956; 12: 477.
 33. VILLELA GG, AFFONSO OR, MITIDIERI E. Études sur la xanthine déshydrogène du sang des bovidés. *Bull Soc Chem Biol* 1957; 39: 553-559.
 34. AFFONSO OR, MITIDIERI E, RIBEIRO LP, VILLELA GG. Blood serum xanthine oxidase of rats poisoned with carbon tetrachloride. *Proc Soc Exptl Biol Med* 1955; 90: 527-529.
 35. MITIDIERI E, AFFONSO OR, RIBEIRO LP. Inhibition of xanthine dehydrogenase by semicarbazide. *Biochem Pharm* 1962; 11: 669-670.
 36. MITIDIERI E, AFFONSO OR, RIBEIRO LP. *In vivo* inhibition of rat blood serum xanthine dehydrogenase by semicarbazide. *Proc Soc Exptl Biol Med* 1963; 112: 549-552.
 37. VILLELA GG, AFFONSO OR, MITIDIERI E. Inhibitory effect of barbiturate on brain and serum xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol* 1966; 15: 1894-1896.
 38. MITIDIERI E, AFFONSO OR. Ethanol induced inhibition in liver and blood serum xanthine dehydrogenase. *Acta Biol Med Germ* 1973; 31: 755-757.
 39. MITIDIERI E, AFFONSO OR, RIBEIRO LP. Xanthine dehydrogenase activity in starved-refed rats treated with 8-azaguanine. *Acta Biol Med Germ* 1974; 32: 695-699.
 40. AFFONSO OR, LEMOS MF, MITIDIERI E. Effect of nicotinamide on the serum xanthine dehydrogenase activity during fasting. *Acta Biol Med Germ* 1975; 34: 1697-1699.
 41. AFFONSO OR, LEMOS MF, SIMAS SM, MITIDIERI E. Effect of large intraperitoneal doses of fatty acids on the rat blood serum xanthine dehydrogenase activity. *Acta Biol Med Germ* 1977; 36: 1191-1192.
 42. GRANGER DH, RUTILI G, MC CORD JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981; 81: 22-29.
 43. OEI WW, STROO WE, BURTON KP, SCHAFFER SW. A possible role of xanthine oxidase in producing oxidative stress in the heart of chronically ethanol treated rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1982; 38: 453-461.
 44. MITIDIERI E, AFFONSO OR, SOUZA ASR. Behaviour of serum xanthine dehydrogenase in the sarcoma induced by 20-methylcholanthrene. *Med Sci Res* 1988; 16: 1165-1166.