

## *Preparación de la beta glucuronidasa para la determinación de hormonas esféricas*

Por las DRAS. LIBUSE MIRCEVOVA, C. Sc.,

ROSA MARÍA RODRÍGUEZ FUENTES Y GLADYS RÓSALE PÉREZ

La Beta glucuronidasa es una enzima que divide los glucuronuros correspondientes dando ácido glucurónico. En forma de glucuronuros hay en el organismo una serie de materias entre las que se encuentra una parte de hormonas esteroides. Solamente estas hormonas que tienen en su carbono tercero un grupo —OH, pueden formar glucuronuros. (Isselbacher y Axelrod).<sup>1</sup> Cuando las hormonas esteroides libres se enlazan en forma de ácido glucurónico, se inactivan (Schneider y otros).<sup>2</sup> Complejos glucurónicos de hormonas esteroides se enlazan a proteínas plasmáticas y en esta forma se transportan en el organismo (Roberts y otros).<sup>3</sup>

En algunos tejidos una hormona inactiva puede ser de nuevo activada de manera que se libera de su complejo glucurónico, por la acción de la beta glucuronidasa. De esta manera se garantiza, que el organismo tiene una cierta reserva de hormonas y que se puede fácilmente adaptar a necesidades momentáneas. Una parte de estas hormonas se elimina en forma de su complejo glucurónico en la orina.

Durante el análisis propio de laboratorio de estas hormonas, se pueden determinar solamente esteroides libres. Por eso esta parte de esteroides que se encuentra en la orina en forma de glucuronuros, tiene que liberarse de su enlace con el ácido

glucurónico antes de la determinación propia, de cuando una muestra de orina es incubada en presencia de la adición de la beta glucuronidasa. En laboratorios clínicos, hoy se trabaja particularmente con la beta glucuronidasa bacteriana comercial.

En nuestro laboratorio de endocrinología se usa la beta glucuronidasa sobre todo en la determinación de 17—OH corticosteroides /170H/ y pregnandiol en orina humana. En vista de la falta de la beta glucuronidasa bacteriana comercial, decidimos preparar la beta glucuronidasa nosotros mismos en nuestro laboratorio. La beta glucuronidasa puede prepararse no solamente de bacterias, sino también de bazo de ternera y de babosas *Patela Vulgata* /P.V./ y otras especies.

El objeto de este trabajo fue determinar qué manera de obtención de la beta glucuronidasa es la más adecuada en el momento actual y si puede usarse en lugar de la babosa P.V. la babosa *Saccia Guaneusis* (S.G.) cubana.

### METODO

La determinación de 17-OH en orina humana fue realizada según método de Romanoff, Rodríguez, Seelye y Pincus.<sup>4</sup> Para medir la actividad de la nueva beta glucuronidasa obtenida por nosotros se

siguió (licito método. Del volumen de orina colectado en 24 horas se toman fracciones alícuotas equivalentes en volumen a 1 Isora del total; y se incubaron con cantidades diferentes de la beta glucuronidasa obtenida de diferentes fuentes.

Todos los análisis fueron ejecutados por duplicado. Los resultados que se dan en las tablas son promedios de los 2 valores medidos y se calcularon por la cantidad total de 17-OH eliminados en orina por 24 horas.

El pregnandiol se determinó por el método de Bongiovani y Clayton.<sup>5</sup>

La preparación de la beta glucuronidasa de bazo de buey según Bemfeld y Fishman<sup>17</sup> y la preparación de la beta glucuronidasa de babosas según Lancet.<sup>8</sup>

Trabajamos con babosas S.G. de agua dulce, traídas de Vinales o Baracoa. En el laboratorio obtuvimos resultados satisfactorios usando el procedimiento siguiente: Se separaron los cuerpos o gibas de las babosas de sus conchas, rompiendo el carapacho y cortando los pies del resto del cuerpo (gibas). En un beaker tarado añadimos suficiente hielo picado y agua helada a 0°C, cuyo peso total sea equivalente a 2 veces el peso de las gibas que se usan en la preparación. La mezcla formada fue homogenizada 5 minutos en un homogenizador corriente de metal inoxidable. El homogenizado formado fue filtrado en un refrigerador a través de la lana de vidrio, y el resto fue de nuevo homogenizado con volumen igual de agua helada. A ambos filtrados recogidos en un mismo recipiente, se añadió una cantidad tal de acetona (químicamente pura) fría cuya concentración final fue 65% por volumen. El sedimento formado se centrifugó y se lavó muy bien varias veces con acetona pura fría. El sedimento lavado se secó al aire a temperatura ambiente durante la noche y el

residuo resultante se pulverizó finamente y se guardó en el refrigerador.

Ejemplo de producto: de 35 babosas fueron separados los cuerpos (gibas) cuyo peso total fue de 258 g. La cantidad total de la beta glucuronidasa preparada fue de 12.5 µg. Esta beta glucuronidasa fue usada junto con todas las determinaciones que se referían en párrafos siguientes.

## RESULTADOS

La primera experiencia de este trabajo fue la preparación de la beta glucuronidasa de bazo fresco de buey. En la tabla 1, se introducen los resultados de las determinaciones de 17-OH en orina sin la beta glucuronidasa añadida y con la beta glucuronidasa bacteriana (Sigma Lab.) o la beta glucuronidasa (preparada en nuestro laboratorio) de bazo de ternera. Esta última enzima fue utilizada en forma de suspensión de la beta glucuronidasa en solución acuosa con sulfato de amonio. De un bazo de ternera obtuvimos aproximadamente 100 mg. de esta suspensión. En la tabla 1 se puede ver que en ausencia de la beta glucuronidasa en orina, se puede obtener una cantidad pequeña de 17-OH totales. Después de la incubación de orina con una solución acuosa de la beta glucuronidasa cruda de bazo, determinó un nivel más alto de 17-OH que fue aproximadamente la mitad del nivel de 17-OH después de incubación de orina con la beta glucuronidasa bacteriana de actividad conocida. De esto se deduce que la actividad de la beta glucuronidasa preparada por nosotros no fue suficientemente grande para que la cantidad utilizada sirviera para la división del complejo glucurónico de 17-OH. Intentábamos elevar la actividad de la beta glucuronidasa de bazo usando una solución buffer distinta. Aunque en la tabla se ve que

la actividad de esta enzima desgraciadamente no se elevó incubando a un pH más bajo. Por este experimento es evidente que debido a la baja actividad de la beta glucuronidasa preparada debemos usar (durante la determinación de 17-OH) una cantidad esencialmente más grande de esta enzima que significará, naturalmente, un número de repeticiones de la preparación de la enzima.

En el siguiente experimento de nuestro trabajo se aisló la beta glucuronidasa de la babosa *Sacrisia Guanensis* (S.G.) según se presenta en la parte superior del papel. Los resultados son introducidos en las tablas números 2.

3 y 4.

En el experimento primero (tabla 2) trabajamos con dos cantidades muy diferentes de la beta glucuronidasa de babosa y como muestra o patrón usamos beta glucuronidasa de babosas P.V.

La beta glucuronidasa que tiene una actividad de 6,000 unidades por gramo. La cantidad de la beta glucuronidasa preparada de babosas P.V. que se añadió a la orina, se calculó de acuerdo con 60 unidades de la beta glucuronidasa por 1 ml. de orina, esto es, la cantidad (pie teóricamente debe ser suficiente para la división de todos los glucuronuros presentes. De los resultados obtenidos. podemos decir que la beta glucuronidasa preparada de la babosa P.V. (que estuvo almacenada largo tiempo a temperatura ambiente) perdió durante su almacenamiento, parte de su actividad. Por consiguiente, la nueva muestra de la beta glucuronidasa preparada de babosas S.G. resultó ser activa. A primera vista es sorprendente ver que su efectividad fue más baja en una solución 25 veces más concentrada. Pero esta no es una actitud esporádica en enzimología. La actividad enzimológica descende en soluciones

donde la concentración de la enzima es demasiado alta, frente a la concentración del sustrato.

En el experimento siguiente nosotros «pusimos convencemos (tabla 3) de que no hubiera sido suficiente (para la determinación de 17-OH) la cantidad de enzima todavía menor «pie la que usamos en el experimento precedente.

Aunque los resultados demuestran que la cantidad de la beta glucuronidasa preparada de babosas S.G. no puede bajarse más sin bajar también el nivel de los 17-OH determinados.

En la tabla 4 presentamos los resultados de la determinación de 17-OH desde la incubación de orina con distintas clases de beta glucuronidasa.

La cantidad de la beta glucuronidasa bacteriana añadida, fin\* calculafla «le manera que por 1 ml. de orina se añadió una cantidad teóricamente suficiente de esta enzima (esto es 60 unidades. por ml.) para producir resultados satisfactorios.

Por estos resultados se puede decir, que también la beta glucuronidasa bacteriana comercial semejantemente a la beta glucuronidasa preparada de babosas P.V. perdió (durante su almacenamiento a largo plazo) una parte de su actividad. La actividad de la beta glucuronidasa aislada «le babosas S.G. es mayor en los preparados del cuerpo (gibas) que en lo del pie de esta babosa.

Con la beta glucuronidasa preparada de babosa S.G. se realizaron en nuestro laboratorio de esteroides, una serie de variadas determinaciones de 17-OH y de pregnandiol. Los valores hallados fueron dentro de los límites de 1.22 a 12.86 mg. por 24 horas de 17-OH respectivamente de 0.16 a 11.6 mg. por 24 horas de pregnandiol y corresponden a valores presentados en la literatura.

## DISCUSION

La actividad de la beta glucuronidasa se puede medir por el método de Fishman y otros" según la cantidad de fenoltaleína liberada de glucuronuro de fenoltaleína. En vista de la falta del substrato para esta determinación, la actividad de la enzima beta glucuronidasa en nuestros preparados fue determinada según la cantidad de la enzima que se necesitó para la liberación de los corticoides de su complejo glucurónico. Este modo de determinar la actividad de la beta glucuronidasa nos dio una respuesta suficientemente satisfactoria a la pregunta de que si una cierta prueba de la betaglucuronidasa puede o no usarse para la determinación de esteroides en orina.

Nosotros no tuvimos experiencias satisfactorias con la preparación de la beta glucuronidasa de bazo. El bazo mismo (que usamos) no es una fuente especialmente rica en esta enzima. Coger el bazo de un animal recién sacrificado e introducirlo en un recipiente que contenga acetona fría (0°C) y llevarlo al laboratorio, es un proceso bastante difícil. También considerablemente difícil es extraer con acetona un tejido muy fuerte lleno de sangre y con muchos vasos resistentes. Estos vasos son también un obstáculo ciertamente inconveniente durante la homogenización. Si extraemos el tejido seco durante la homogenización con la solución lampón, y después centrifugamos los homogenizados en centrífuga no refrigerada es fácil la desnaturalización de la enzima que no sucede homogenizando en una centrífuga refrigerada. El precipitado de la beta glucuronidasa obtenida por saturación del extracto crudo de bazo con sulfato de amonio, contiene una cantidad grande de esta sal. Si quitamos esta sal por diálisis, obtenemos una solución acuosa diluida de beta glucuronidasa que es menos constante que un preparado deseado, durante el almacenamiento.

La preparación de la beta glucuronidasa de la babosa S. G. nos dio buenos resultados en nuestro laboratorio. Durante la preparación de ésta no se presentaron obstáculos especiales, solamente se debe trabajar lo más rápido posible y tener cuidado de que la temperatura, durante todo el proceso, se mantenga alrededor de 0°C. El aislamiento de la beta glucuronidasa del cuerpo (giba) de babosa es más cómodo que el aislamiento del pie. El pie contiene la musculatura más resistente de manera que, durante una homogenización corta, los pies no pueden ser homogenizados bien y durante un tiempo más prolongado de homogenización, a su vez sube la temperatura de la mezcla. En el caso uno, cuando no separamos cuerpos de los pies, pero homogenizamos todo junto, subió la temperatura durante esta operación, tan considerablemente, hasta provocar desnaturalización de la enzima.

Es más adecuado usar solamente los cuerpos de la babosa S. G. y homogenizar estos tejidos directamente con hielo picado.

De los resultados de nuestros experimentos se deduce que la babosa cubana S. G. es una fuente adecuada y rica de donde se aísla la beta glucuronidasa. Aunque junto a cada muestra de una nueva preparación es necesario convencerse de su actividad por ejemplo, por medio de la determinación de la 17-OH corticoides en orina. La orina normal humana se incubaba con una cantidad diferente de la beta glucuronidasa preparada y eventualmente con una muestra como patrón de esta enzima de actividad conocida. De los resultados obtenidos la cantidad de la beta glucuronidasa adecuada para cada determinación.

En conjunto podemos decir, que la beta glucuronidasa preparada de la babosa S. G. (de la manera expuesta anteriormente) sustituye en el laboratorio los preparados comerciales caros y dificilmente asequibles.

#### SUMARIO

Durante la determinación de 17-OH en orina se trabajó con la beta glucuronidasa de origen diferente, es decir, con la beta glucuronidasa bacteriana comercial, la beta glucuronidasa preparada de babosa P. V. y S. G. y la beta glucuronidasa aislada de bazo de buey.

En nuestro laboratorio fue aislada la beta glucuronidasa de babosa S. G. y de bazo de buey. Se determinó que cuerpos (gibas) de la babosa S.G. son una fuente adecuada para la preparación de la beta glucuronidasa.

#### SUMMARY

During the determination of 17-OH in urine, beta glucuronidase of various sources was employed; this means that we used commercial bacterial beta glucuronidase,

beta glucuronidase prepared from P. V. and S. G. slugs and beta glucuronidase isolated from ox spleen.

In our laboratory beta glucuronidase from S. G. slug and from ox spleen was isolated. The authors determined which bodies (humps) of S. G. slug constitute an adequate source for the preparation of beta glucuronidase.

#### RESUME

Dans la détermination des 17-OH dans l'urine on a employé des béta-glucuronidases de différents origines, c'est-à-dire, de la béta-glucuronidase bactérienne commerciale, de la bétaglucuronidase préparée de limace P. V. et S. G. et de la béta-glucuronidase isolée de la rate de boeuf.

Dans le laboratoire de l'auteur on a isolé de la béta-glucuronidase de la limace S. G. et de la rate de boeuf. On a déterminé que le corps ou la bosse de la limace S. G. constitue une source adéquate pour l'obtention de béta-glucuronidase.

**TABLA I**

LA DETERMINACION DE 17-OH EN ORINA USANDO LA BETA GLUCURONIDASA  
DE RAZO Y DE BACTERIAS

Fuente de la beta glucuronidasa	Cantidad de la beta glucuronidasa añadida por 100 ml. de orina	pH durante la incubación de la muestra	mg. de la 17-OH eliminados durante 24 horas
<b>0</b>	<b>0</b>	<b>6.5</b>	<b>0.33</b>
<b>bazo</b>	<b>0.5 ml.*</b>	<b>6.5</b>	<b>1.49</b>
<b>bazo</b>	<b>3.0 ml.†</b>	<b>6.5</b>	<b>2.40</b>
<b>bazo</b>	<b>3.0 ml.*</b>	<b>4.5</b>	<b>2.16</b>
<b>bacterias</b>	<b>4.500 u.</b>	<b>6.5</b>	<b>4.73</b>

\* Solución obtenida de un solo bazo de buey (para detalles mirar el texto).

**TABLA II**

LA DETERMINACION DE 17-OH EN ORINA USANDO LA BETA GLUCURONIDASA AISLADA DE  
BABOSAS P.V. Y S.G.

Fuente de la beta glucuronidasa	Cantidad de la beta glucuronidasa añadida por 100 ml. de orina	mg. de la 17-OH eliminados durante 24 horas
<b>P. V.</b>	<b>10 mg./6.000 n.</b>	<b>1.02</b>
<b>S. G.</b>	<b>6.6 mg.</b>	<b>3.88</b>
<b>S. G.</b>	<b>165 mg.</b>	<b>2.00</b>

**TABLA III**

LA DETERMINACION DE 17-OH EN ORINA USANDO DIFERENTES CANTIDADES DE LA BETA  
GLUCURONIDASA PREPARADA DE BABOSA S.G.

Fuente de la beta glucuronidasa añadida por 100 ml. de orina	mg. de la 17-OH eliminados durante 24 horas
<b>1.6 mg.</b>	<b>4.42</b>
<b>3.3 mg.</b>	<b>4.49</b>
<b>6.6 mg.</b>	<b>4.68</b>

**TABLA IV**

LA DETERMINACION DE 17-OH EN ORINA USANDO LA BETA GLUCURONIDASA  
DE BABOSA Y DE BACTERIAS

Fuente de la beta glucuronidasa	Cantidad de la beta glucuronidasa añadida por 100 ml. de orina	mg. de la 17-OH eliminados durante 24 horas
<b>bacterias</b>	<b>6.000 u.</b>	<b>4.06</b>
<b>babosa P. F.</b>	<b>15 mg.</b>	<b>4.20</b>
<b>babosa S. G.</b>		
<b>cuerpo ("ibas)</b>	<b>15 mg.</b>	<b>5.35</b>
<b>babosa S. G. (pie)</b>	<b>15 mg.</b>	<b>3.31</b>

## BIBLIOGRAFIA

1. —*Iselbacher, K. J., Axelrod, L. R.*: Enzymatic Formation of Corticosteroid Glucuronides. J. Amer. Chem. Soc. 77:1070-1, 1955.
2. —*Schneider, J. J., Lewhart, M. L.*: Enzymatic Synthesis of steroid sulfates. J. Biol. Chem. 222:787-794, 1956.
3. —*Roberts, S., Szego, C. M.*: Steroid Interaction in metabolism of Reproductive target organs. Physiol. Rev. 33:593-629, 1953.
4. —*Ronumoff, L. P., Rodriguez, R. M., Seelye, J. M., Pincus, G.*: Determination of tetrahydrocortisone in the urine of normal and schizophrenic men. J. Clin. Endocrinol. and Metabolism, 17:777-785, 1957.
5. —*Bongiovanni, A. M., Clayton, G.* WA simplified method for the routine determination of pregnandiol and prenantriol in urine. Bulletin of the Johns Hopkins Hospital, 94:180-186, 1954.
6. —*Bernfeld, P., Fishman, H. H.*: Isolation of B glucuronidase of calf spleen, Archiv. of Biochemistry, 27:475-6, 1950.
7. —*Bernfeld, P., Fishman, H. H.*: B glucuronidase I. Purification of calf spleen B glucuronidase. J. Biol. Chem. 202:757-762, 1953.
8. —An interim recommendation by a medical research council committee on clinical endocrinology. Chairman Dr. J. H. Gaddum. A standard method of estimating 17-oxosteroids and total 17-oxogenic steroids, Lancet, Vol. I, 1963 No. 7296, 1415-9.
9. *Fishman, W. H., Sprinter, S., Brunetti, R.*: Application of improved glucuronidase assay method to study of human blood beta glucuronidase. J. Biol. Chem. 173: 449-456, 1948.

In the article «Black Dots in Chromoblastomycosis» published in vol. 3, number 4, p. 507, should be read in the summary, first paragraph, as follows: The scales were subjected to appropriate processes and benzidine, guaiacum and hemin crystals formation analyses were *positivo*.

Dans l'article «Les points noirs dans la Chromoblastomycose» publié dans le vol. 3, No. 4, p. 507, on doit lire dans le résumé, premier paragraphe: les squames ont été soumises à des procédés appropriés et les

analyses réalisées: celles de la benzidine, du gaiac et de la formation d'hémine ont donné des résultats *positifs*.