

R. esp. Fisiol.  
Tom. I, num. 1, páginas 50 a 57. 1945.

Cátedra de Fisiología de la Facultad de Medicina de Barcelona  
(Prof. Juan Jiménez Vargas)

## **Estudio experimental sobre algunos aspectos de la acción de la ureasa y su inhibición por la Penicilina**

JUAN JIMÉNEZ VARGAS y JOSÉ MONCHE ESCUBÓS

### **Introducción**

Nos planteamos el estudio de la acción de la ureasa en diferentes aspectos que creemos de interés práctico, teniendo en cuenta que dadas las características de la especificidad de este fermento (BONNET y RAZAFIMAHARY (1), múltiples factores pueden influir en las determinaciones de nitrógeno ureico efectuadas por el método de VAN SLYKE y CULLEN.

Por otra parte, hemos investigado la inhibición penicilínica de la ureasa (TURNER, HEAT y MAGASANI (2) y FLOREY (3), que creemos interesante, puesto que no encontramos datos experimentales en la bibliografía sobre este efecto inhibitor en presencia de mezclas complejas como las utilizadas por nosotros, con la finalidad esencial de trabajar *in vitro* en medios lo más posiblemente comparables con los líquidos fisiológicos:

### **Parte experimental**

Se dispusieron 27 tubos en ensayo en las gradillas correspondientes, para introducirlos en la estufa a 38° e ir retirándolos a intervalos regulares de tiempo, con objeto de efectuar cada determinación.

Los tubos 1 al 5 inclusive, contenían 12 c. c. de una diso-

lución de metilurea, succinamida, nicotinamida y urea, preparada disolviendo 1 dg. de las tres primeras y 2 dg. de la cuarta, en líquido Tyrodé, hasta completar el volumen de 60 centímetros cúbicos.

Se preparó, además, separadamente, 20 c. c. de una disolución de ureasa al 10 %, operando según Van Slyke y Cullen. Dividida, pues, en cinco partes iguales, se agregó 4 c. c. por tubo, de dicha disolución. El volumen total de líquido contenido en cada tubo fué, por lo tanto, de 16 c. c.

Para detener la acción de la ureasa al sacar cada tubo de la estufa, se agregaban 5 gotas por tubo de una disolución acuosa de cloruro mercúrico, aproximadamente al 6 por mil.

Eliminado el amoníaco formado, según el método de Van Slyke y Cullen, para determinarlo colorimétricamente mediante el reactivo de Nessler, se obtuvieron los siguientes resultados, expresados en mgrs. de nitrógeno amoniacal procedente del contenido de cada tubo :

Mezcla de nicotinamida, succinamida, metilurea y urea

Tiempo en minutos	Temperaturas en grados centigrados	Nitrógeno amoniacal formado, expresado en mgrs. por 16 c. c. de líquido contenido en cada tubo
30	8 °	0,95
30	38 °	10,55
60	38 °	8,20
90	38 °	4,30
120	38 °	4,10

Las determinaciones colorimétricas se efectuaron agregando 0,3 c. c. de reactivo Nessler por tubo, mediante una microbureta, para comparación de la intensidad de coloración en el colorímetro de Dubosq, con una disolución tipo de sulfato amónico, según la técnica de Wakeman y Morrell.

Mezcla de nicotinamida, succinamida, metilurea, urea y hexandiamida

Se empleó de la misma concentración y demás condiciones operatorias idénticas a las precedentes, con la sola diferencia de agregar 2 dg. de hexandiamida en substancia.

Tiempo en minutos	Temperaturas en grados centígrados	Nitrógeno amoniacal formado, expresado en mgrs. por 16 c. c. de contenido de cada tubo
30	8 °	0,63
30	38 °	0
60	38 °	6,10
90	38 °	27,00
120	38 °	20,00

La hexandiamida es escasamente soluble en el agua ; pero empleada a la concentración indicada se obtiene una disolución, previa ligera calefacción y agitando, cuidando, naturalmente, de efectuarlo por separado con parte del líquido Tyrode necesario para completar el volumen de la disolución final al de los 60 c. c. del caso precedente.

#### Mezcla de urea y hexandiamida

Se preparó disolviendo separadamente 2 dg. de urea en 20 centímetros cúbicos de líquido Tyrode y otros 2 dg. de hexandiamida en 20 c. c. del mismo líquido. Mezcladas ambas disoluciones y completado el volumen con líquido Tyrode hasta los 60 c. c., se obtuvieron los resultados expuestos a continuación, al operar de modo idéntico al ya descrito :

Tiempo en minutos	Temperaturas en grados centígrados	Nitrógeno amoniacal formado por contenido de cada tubo
30	8 °	0
30	38 °	0
60	38 °	0,04
90	38 °	0,03
120	38 °	1,70

#### Hexandiamida sola

Se disolvieron 2 dg. de hexandiamida en 50 c. c. de líquido Tyrode, completando después el volumen hasta los 60 c. c. Las demás condiciones operatorias fueron, pues, idénticas a las ya descritas.

Tiempo en minutos	Temperaturas en grados centígrados	Nitrógeno amoniacal formado por contenido de cada tubo
30	8 °	0
30	38 °	0
60	38 °	0

#### Disolución tipo de urea sola

Se preparó disolviendo 2 dg. de urea en los 60 c. c. de líquido Tyrode, operando siempre en identidad de condiciones.

Tiempo en minutos	Temperatura en grados centígrados	Nitrógeno amoniacal formado por contenido de cada tubo
30	8 °	10,8
30	38 °	10,9
60	38 °	10,7

Teóricamente, como cada tubo contiene 12 c. c. de disolución de urea al 0,333 %, o sea 0,04 grs. de urea, la cantidad de nitrógeno amoniacal desprendido debe, pues, ser de 0,0186 gramos, o sea de 18,6 mgrs.

#### Ensayos en presencia de penicilina

Empleamos penicilina de Producción Nacional, «Penicilina OM Tópica» preparada por la Sociedad General de Farmacia, en ampollas de 1000 unidades Oxford, que nos fué facilitada amablemente.

El producto se presenta en forma de polvo amorfo, de color pardusco, disolviéndose muy bien en el líquido Tyrode. Preparamos, pues, una disolución de penicilina en Tyrode, completándola hasta el volumen de 20 c. c. ; 10 c. c. de esta disolución equivalían, por lo tanto, a 500 unidades Oxford de penicilina.

Seguidamente preparamos, por separado, dos disoluciones, una de la mezcla de todas las amidas mencionadas en este trabajo, o sea de nicotinamida, succinamida, metilurea, urea

y hexandiamida, y la otra de urea sola, operando en absoluta identidad de condiciones experimentales.

Disolvimos, por lo tanto, 2 dg. de cada una de las amidas de la mezcla, en el líquido Tyrode, hasta el volumen de 60 c. c. Dividimos en dos partes exactamente idénticas la disolución resultante, agregando a una de ellas 10 c. c. de líquido Tyrode y a la otra también 10 c. c., pero de la disolución de penicilina en líquido Tyrode. Quedaron, pues, así, dos disoluciones idénticas de la mezcla de amidas: una sin penicilina y la otra con penicilina.

Operando del mismo modo, en condiciones idénticas, preparamos otras dos disoluciones de urea sola en líquido Tyrode, con y sin penicilina, respectivamente.

Seguidamente, añadimos a cada una de las cuatro disoluciones mencionadas, 10 c. c. de disolución de ureasa en 60 c. c. de dicho líquido, para introducir las inmediatamente en la estufa a 37° y mantenerlas a esta temperatura durante una hora.

Transcurrido este tiempo, agregamos a cada disolución 1 c. c. de disolución acuosa de cloruro mercúrico al 6 por mil, aproximadamente, para detener la acción de la ureasa y proceder al arrastre en corriente de aire del amoníaco formado, operando según el método de Van Slyke y Cullen (loc. cit.). La disolución de la sal amoniaca resultante de la fijación del amoníaco en ácido diluido, la titulamos colorimétricamente, en cada caso, mediante el reactivo Nessler, del modo ya expuesto en este trabajo.

Substancias	Temperatura en grados centígrados	Tiempo en minutos	Nitrógeno amoniacal formado, expresado en miligramos por disolución problema
Mezcla de amidas sin penicilina ... ..	37°	60	8,77
Mezcla de amidas con penicilina ... ..	37°	60	3,15
Urea sin penicilina... ..	37°	60	7,56
Urea con penicilina... ..	37°	60	3,60

Como quiera que el objeto del presente trabajo no ha sido el de obtener valores absolutos de amoníaco formado, sino sólo el de conseguir, según se habrá observado, resultados totalmente comparables, nos hemos atendido en la realización del mismo, exclusivamente a la identidad de condiciones operativas.

La ureasa, así como la nicotinamida, succinamida, metilurea y urea empleadas, procedían de las Casas Merck y E. de Haen; la hexandiamida fué utilizada también purísima, de la preparada al efecto por uno de nosotros.

Todas las disoluciones de ureasa fueron cuidadosamente centrifugadas y decantadas sobre un filtro de vidrio poroso, a presión reducida, antes de ser empleadas, comprobando su reacción negativa frente al reactivo Nessler.

Igualmente se procedió con el mayor cuidado el examen de las disoluciones de las amidas objeto de estudio, comprobando previamente la ausencia de reacción de las mismas frente al reactivo Nessler, en cada ensayo.

Del mismo modo, todo el material de vidrio utilizado fué de vidrio neutro.

Los valores bajos de nitrógeno amoniacal que hemos obtenido, obedecen, como es fácil observar, no sólo a la ligera alcalinidad del líquido Tyrode, sino a la insuficiente cantidad de ureasa empleada por nosotros, para conseguir resultados cuantitativos, a fin de evitar los inconvenientes del manejo de disoluciones con excesiva tendencia a la formación de espuma, especialmente en presencia de penicilina, por sus posibles influencias sobre las condiciones de comparabilidad de los resultados de nuestros ensayos.

### Conclusiones

Del examen de los datos experimentales que acabamos de exponer, podemos llegar a la conclusión de que no es fácil precisar resultados en las determinaciones de nitrógeno ureico efectuadas por el método de la ureasa, en medios en los que sea probable la existencia, junto a la urea, de otras combinaciones orgánicas de función amídica o diamídica, como es el caso de los medios fisiológicos (sangre, orina, líquidos de perfusión que han circulado por órganos aislados, etc., etc.) de

composición química compleja, y en general no bien conocida, sobre todo en condiciones patológicas, cuando es manifiesta la existencia de procesos autolíticos de desintegración de compuestos orgánicos de naturaleza proteica.

Los hechos que pueden observarse en la tabla correspondiente a los resultados obtenidos respectivamente operando en ausencia o presencia de penicilina, sobre mezclas de amidas o sobre urea sola, corroboran la conclusión anterior. La penicilina, operando en condiciones lo más fisiológicamente posibles, inhibe fuertemente la acción de la ureasa y este es un dato más en apoyo de la afirmación anterior, puesto que pueden existir en los medios biológicos en los que se practican las determinaciones de urea, agentes de acción comparable, todavía no identificados químicamente.

Sin embargo, no son datos suficientes para dudar del valor práctico de estas determinaciones en el diagnóstico clínico, puesto que cuando se aplican al efecto, se opera en identidad de condiciones experimentales y con arreglo a técnicas muy conocidas y perfectamente establecidas para que los resultados sean comparables, aunque generalmente, de valor muy relativo.

En cambio, no puede afirmarse lo mismo cuando se buscan valores absolutos, en trabajos de pura investigación bioquímica.

#### Resumen

Se estudia la acción de la ureasa, sobre urea sola y mezclas de urea y otras diamidas, comparativamente con otras experiencias en las que se añade penicilina a mezclas de las mismas proporciones, observándose que la penicilina inhibe fuertemente la ureasa.

#### Summary

We study the action of the urease on urea alone or on mixtures of urea and other diamides in comparison with other experiments, in which penicilin is added to mixtures of the same proportions. It will be observed, that the penicilin strongly inhibits the urease.

#### Zusammenfassung

Man studiert die Wirkung der Urease auf Harnstoff allein und Mischungen auf von Harnstoff und anderen Diamiden im Vergleich mit anderen Versuchen in denen man Penicilin zu den Mischungen im selben Verhältnis hinzufügt. Man kann beobachten, dass das Penicelin die Urease stark hemmt.

Bibliografía

- (1) BONNET, R. y RAZAFIMAHERY, R. *Enzymología*, 1, 55, 1936.
- (2) TURNER, J. C. HEATH, F. K. y MAGASANI, K. B. *Nature*, 152, 326, 18-9-43.
- (3) FLOREY, M. E. y FLOREY, H. W. *Lancet*, 1, 387, 1943.