El fraccionamiento de núcleos de eritrocitos de pollo y la concentración del virus de la influenza

por S. Lajmanovich y N. Mittelman.

En un trabajo anterior, juntamente con el Dr. Parodi (1) se demostró que la curiosa propiedad que poseen los eritrocitos de pollo de adsorber y en determinadas condiciones eluir, al virus de la influenza Hirst, (2) y (3) se conserva en forma cuantitativa si se reemplazan los eritrocitos enteros por su núcleos obtenidos por hemólisis con saponina (4).

En el presente trabajo se encara el problema del fraccionamiento de los núcleos y se describe la obtención de una fracción, fundamentalmente proteica, que conserva la propiedad de absorber y eluir al virus de la influenza y que ofrece interesantes perspectivas para la concentración y purificación del virus.

El fraccionamiento de los núcleos de eritrocitos de pollo o similares y el estudio de su composición química ha sido abordado en diversas oportunidades desde diferentes puntos de vista. Poco después que Kossel en 1884 (5) demostró la existencia en los núcleos de eritrocitos de ganso de una proteína básica, a la que denominó histona, Ackerman (6) realizó un análisis químico cuantitativo de los mismos, confirmando los resultados previos de Bang en el sentido de que aparte de cierta cantidad de lípidos, los componentes fundamentales del núcleo lo constituían la citada histona de Kossel (57,7 %) en combinación salina con un ácido nucleico (43,1 ‰) (nucleohistona).

Aunque ésta es todavía la opinión más aceptada respecto de la constitución química de núcleos de eritrocitos de aves y en ese sentido Laskowsky y Ryerson (7) describieron hace poco un procedimiento sencillo de extracción directa de la nucleohistona por soluciones de cloruro de sodio de concentraciones variables, Stedman y Stedman en un trabajo reciente (8) afirman rotundamente, como

Presentado en la reunión de comunicaciones del 18 de setiembre de 1945.

consecuencia de muchos años de trabajo, que en todos los núcleos existe además de los lípidos y de la nucleohistona ya citada, una nueva proteína que denominan "cromosomina" y que representaría la mayor parte del núcleo (33 % en el caso de núcleos de eritrocitos de pollo libres de lípidos [9]). Los autores ven en esa nueva proteína el constituyente fundamental de los cromosomas y el asiento de las reacciones de coloración, típicas de núcleos (Feulgen). Muchas de las conclusiones de dicho trabajo han sido muy discutidas posteriormente (10 y 11); pero en lo que respecta al interés directo en la "cromosomina" como una nueva unidad química dentro del núcleo, los autores, desgraciadamente, no suministran ningún detalle acerca del método utilizado por ellos, para aislar esta nueva fracción proteica.

Finalmente y como podía preveerse se han descripto en diferentes oportunidades diversos sistemas enzimáticos existentes dentro del núcleo (12), (13), etc.

De acuerdo a estos antecedentes se procedió a desarrollar un plan de trabajo que permitiera en primera instancia adscribir la propiedad de absorción del virus de la influenza a alguna de las grandes fracciones químicas descriptas; se estudió así, sucesivamente, la acción de distintos agentes químicos, oxidantes, reductores, e inhibidores enzimáticos etc. sobre la adsorción del virus por los núcleos y el fraccionamiento de estos últimos mediante extracciones por disolventes orgánicos y por soluciones salinas de concentración variable.

a) *Acción de agentes químicos.* — Ya en otra oportunidad se había intentado estudiar la acción que diferentes agentes químicos tienen sobre la propiedad adsorbente de los eritrocitos enteros; pero la hemólisis concomitante enmascaró a tal punto la reacción que fué prácticamente imposible seguir el curso de la adsorción del virus. La utilización de núcleos aislados suprime, por supuesto, dichos inconvenientes.

Se preparó la suspensión de núcleos por hemólisis con saponina (4) y se lavó con solución fisiológica hasta la extracción completa de la hemoglobina.

Se ensayó la acción de las siguientes drogas: cianuro de potasio 0,01 M, sulfito de sodio 0,01 M, hidrosulfito de sodio 0,01 M, formol al 3 ‰, agua oxigenada 0,01 M, nitrito de sodio 0,01 M, mertiolato de potasio al 0,2 ‰ y permanganato de potasio 0,001 M.

El pH final de las soluciones osciló en todos los casos entre 7,0 y 7,6. Se hicieron ensayos de adsorción con virus A. de influenza, (cepa 7) diariamente, y por espacio de una semana.

Ninguna de las sustancias ensayadas modificó en forma sensible el poder de adsorción de los núcleos para el virus, indicando que la propiedad en cuestión no estaba vinculada a ninguno de los numerosos sistemas de óxido-reducción susceptibles de ser afectados por algunas de las sustancias utilizadas.

b) *Extracción con disolventes orgánicos.* — El objeto fundamental, es por supuesto, la separación de los lípidos y también

de la xantófila, que según Dounce (4), es la responsable del color amarillo de los núcleos.

Los disolventes ensayados fueron alcohol metílico, alcohol etílico y acetona. En todos los casos se completó la extracción con un tratamiento final con éter.

Método. — Núcleos provenientes de uno 100 ml. de eritrocitos de pollo centrifugados a baja velocidad (1.500 r. p. m.), de color amarillo intenso fueron divididos en tres porciones y resuspendidos en 50 ml de solución fisiológica (0,9 %); a cada una de las fracciones se le agregó en frío (2°, 3° C.), poco a poco y agitando, un volumen igual de alcohol metílico (método A), alcohol etílico (método B) o acetona (método C) respectivamente; media hora más tarde se centrifugaron y los residuos se trataron con soluciones enfriadas de los respectivos disolventes al 75 % de concentración (en solución fisiológica); después de una nueva centrifugación los núcleos fueron extraídos directamente con los disolventes puros y finalmente con éter hasta sobrenadante incoloro. El residuo etéreo, totalmente blanco, fué inmediatamente resuspendido en unos ml. del disolvente respectivo (alcohol metílico, etílico o acetona) y tratado luego con un gran exceso de solución fisiológica agregada poco a poco; finalmente se lavó el residuo varias veces por centrifugación con solución fisiológica.

La suspensión así obtenida y que representa en peso aproximadamente el 70 % de la suspensión primitiva de núcleos, es extremadamente estable y presenta al microscopio, desde el punto de vista morfológico, un aspecto muy semejante al de los núcleos enteros, aunque algo más pequeños.

Es importante hacer notar que en el método descripto hay que extremar el agregado paulatino de los disolventes (sobre todo si se utiliza alcohol etílico), pues de lo contrario, se produce una coagulación masiva de los núcleos y la pérdida casi total de sus propiedades adsorbentes.

En el cuadro Nº 1 están los resultados obtenidos al ensayar el poder adsorbente de las distintas fracciones, frente al virus A de la influenza.

De acuerdo a los resultados del cuadro Nº 1 la propiedad adsorbente se halla indudablemente ligada al residuo insoluble en disolventes orgánicos, de naturaleza fundamentalmente proteica (nucleohistona, cromosomina, resto de estroma...?) con reacciones de Biuret y Feulgen intensamente positivas.

Por la capacidad adsorbente del residuo y por la rapidez de la extracción el disolvente más adecuado es sin duda el alcohol metílico. La suspensión estéril de la fracción Ai conserva sus propiedades adsorbentes aún después de varios meses de conservación a 4° C.. Igual que en el caso de glóbulos enteros el residuo de la elución es incapaz de adsorber nuevamente virus.

c) *Extracción de la fracción Ai por soluciones de cloruro de sodio.* — De acuerdo a los resultados obtenidos por Laskowsky y Ryerson (7) se ensayó la extracción del residuo insoluble en alcohol metílico y éter (fracción Ai, que como dijimos, retenía la propiedad de adsorber al virus de la influenza) por soluciones de cloruro de sodio del 1 al 5 % y reprecipitación ulterior de la

CUADRO N.° 1

METODO	Fracción	Adsorción de virus A de influenza	Elución a 37° C.
Método A. Alcohol metílico y éter	Fracción Ai*	95 - 99 %	90 - 95 %
	Fracción As**	0	—
Método B. Alcohol etílico y éter	Fracción Bi*	90 - 95 %	85 - 90 %
	Fracción Bs**	0	—
Método C. Acetona y éter .	Fracción Ci*	90 - 95 %	85 - 90 %
	Fracción Cs**	0	—

*) Residuos insolubles en los disolventes respectivos.
**) Residuos provenientes de la evaporación al vacío de las fracciones solubles.

solución salina de alta viscosidad, por diálisis contra solución fisiológica; los resultados obtenidos fueron contradictorios; en la mayoría de los casos ambas fracciones, la soluble en solución de cloruro de sodio y la insoluble, perdían la propiedad de adsorber al virus de la influenza. Sólo en un caso la fracción insoluble conservó intacta la propiedad en cuestión; pero dicho resultado no pudo ser confirmado.

Finalmente la nucleohistona "sintética" obtenida por mezcla directa de solución de histona de núcleos de eritrocitos de pollo y ácido nucléico de la misma fuente, no fué capaz de adsorber al virus de la influenza.

d) *Utilización de la fracción Ai para purificar y concentrar al virus de la influenza.* — Recientemente Stanley (14) realizó un estudio comparativo de los métodos más utilizados para la concentración y purificación del virus de la influenza; los mejores resultados los obtuvo por centrifugación diferencial a 24.000 r. p. m. con un rendimiento del 70 % desde el punto de vista de la aglutinación y un producto final homogéneo a la ultracentrífuga que contenía alrededor de 22.500 dosis aglutinantes por mgr. de nitrógeno.

El método de adsorción-elución con eritrocitos de pollo o de embrión, que también fué ensayado por Stanley, tiene, desde el punto de vista de la purificación, un serio inconveniente en la hemólisis parcial concomitante con el fenómeno de evolución, que eleva notablemente el porcentaje de proteinas extrañas, llegando a un producto final de 6.000 dosis aglutinantes por mgr. de nitrógeno.

Desde este punto de vista la fracción de núcleos (Ai) insoluble en alcohol metílico y éter tiene numerosas ventajas sobre la utilización directa de los glóbulos rojos: en primer lugar el factor hemólisis queda totalmente eliminado, es además mucho más estable