

Proteolisis péptica de sueros antidiftéricos

Por FERNANDO MODERN y GUILLERMO RUFF

En conocimiento de la patente de Parfentjev ⁽¹⁾ nos propusimos estudiar las condiciones óptimas de la acción de la pepsina, papaína y tripsina en la proteolisis del suero antidiftérico, con miras hacia su purificación y estudio de las condiciones físico-químicas de esta desintegración proteolítica ⁽²⁾. Conseguimos una buena purificación que llegaba a 62.000 U. A. por gramo de proteína. También estudiamos la acción conjunta de diversas enzimas proteolíticas: Una predigestión péptica y luego una papaínica o tripsínica. Las propiedades antitóxicas de estas proteínas proteolizadas son iguales a las de las antitoxinas sin modificar como lo prueban Weil, Parfentjev y Bowman ⁽³⁾ en un trabajo recientemente publicado.

Ensayamos también la influencia de estas enzimas en la purificación del suero antitetánico ⁽⁴⁾ consiguiendo una purificación de 3 veces con respecto al suero primitivo.

Como interesaba conocer sobre qué fracciones proteicas influía la pepsina estudiamos la acción de la pepsina sobre euglobulina, la seudoglobulina y la albúmina ⁽⁵⁾, encontrando diferencias apreciables, eliminándose por digestión y ultrafiltración la fracción albumínica en los sueros normales y antidiftéricos.

Por otra parte, diferentes autores estudian también la proteolisis péptica de los sueros antitóxicos; Hansen ⁽⁶⁾ describe un método fundado en la patente de Parfentjev purificando el suero antidiftérico por proteolisis péptica y adsorción con hidrato de aluminio. Concentra al final el suero antidiftérico precipitando las globulinas por el método salino y dializando por último.

Pope ⁽⁷⁾ da un nuevo método que consiste en aplicar la termocoagulación a los sueros proteolizados. El método consiste en líneas generales en una proteolisis péptica que no dura más de una hora, seguida de una termocoagulación a 60° C en presencia de Cl Na

Recibido en Octubre de 1939.

al 5 %. En otro trabajo recientemente publicado Pope (8) estudia el efecto del calor a bajo pH antes de la acción enzimática y después, y logra en algunos pocos casos una purificación hasta de 5 veces. (En general no pasa de 2,5-3,0 veces). También investiga la acción del $\text{SO}_4 \text{Am}_2$ y Cl Na en la precipitación por el calor de las antitoxinas proteolizadas y por último la acción de diferentes cantidades de pepsina en la purificación de los sueros.

Sandor (9), aplicando el método de Pope, es decir, combinando la acción péptica con una coagulación selectiva, llega a purificar el suero antidiftérico de 4 a 5 veces. Este mismo autor (10), por digestión péptica de floculados de antitoxina y toxina a 38°C y entre pH 3 y 4 consigue con sólo un rendimiento de 25 a 30 % una purificación de 15 a 20 veces.

Pope y Healey (11), proteolizando el mismo floculado con pepsina, obtienen una antitoxina que da 135.000 unidades por gramo de proteína. El rendimiento obtenido por estos autores llega al 60 % de las unidades primitivas.

La gran pureza obtenida por disociación del floculado de toxina más antitoxina era ya conocida, y uno de nosotros (12), en colaboración con Wernicke, estudiando esta disociación por ácidos, llegó a más de 100.000 unidades por gramo de proteínas.

En el trabajo que describimos a continuación estudiamos todas las variantes que intervienen en la proteolisis y en la termo-coagulación: influencia de diferentes concentraciones de $\text{SO}_4 \text{Na}_2$ y ClNa , acción de la temperatura, del tiempo de calentamiento, dilución de los sueros, acción del tricresol y otros antisépticos, etc.

Hemos operado con plasma, con sueros ya proteolizados, con sueros nativos y con sueros concentrados por el método salino. Por último damos una serie de ensayos sobre las albumosas formadas por el método de Parfentjev y que nos permiten separarlas del suero antitóxico.

Termocoagulación del plasma. — Ensayamos un plasma que contenía 800 U. A. por cm^3 , al que llevamos a pH 4,0-4,1 agregando acético al 20 % y 5 % de ClNa . Este plasma así tratado fué calentado a $53-54^\circ \text{C}$. durante 10-60 minutos en volúmenes de 10 cm^3 , agregando luego 40 cm^3 de H_2O , agitando y filtrando. Se pudo comprobar que en el filtrado no se encontraba antitoxina. Pero si teníamos la precaución de agregarle a cada porción de 10 cm^3 del suero anterior 0,1 gr. de pepsina (P. D. 1/10.000) el filtrado contenía antitoxinas y en el Cuadro que va a continuación damos los resultados obtenidos.

CUADRO I

Temperatura	Tiempo de calentamiento en minutos	Unidades (cm ³)	Proteínas %	U. A. por gr. proteína	Pérdida %
Plasma original. (1+4).	—	160	2,1	7.600	—
53°	10	100	1,40	7.100	37,5
53°	20	100	1,35	7.400	37,5
53°	30	100	1,30	7.700	37,5
53°	60	80	1,30	6.100	50
58°	5	100	1,30	7.700	37,5
58°	10	100	1,30	7.700	37,5
58°	20	100	1,30	7.700	37,5
58°	30	80	1,30	6.100	50
58°	60	80	1,30	6.100	50

La relación de purificación no mejora, si bien se nota la influencia de la pepsina, pues en ausencia de esta substancia no hay redisolución de las antitoxinas. Luego, sin una pre-digestión péptica no mejora la relación U. A/proteínas.

Pensando en la influencia que podría tener en la coagulación la presencia de un gel, ensayamos el $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$ (preparado por la técnica de Utkin) y el $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Willstätter). A 250 cm³ de plasma se le agregaron 10 cm³ de agua que contenía 1 gr. de pepsina y se llevó a pH 4, otra porción igual a pH 3,5 y por último otra a pH 3,0.

A estos pH y con pepsina se mantuvo el plasma a 47° C durante 1 hora. Luego se repartió en porciones de 50 cm³ agregándole la sal y el gel en las siguientes proporciones:

- 1) 2,5 gr. de Cl Na y 2,5 cm³ gel $(\text{PO}_3)_2\text{Ca}_3$
- 2) 2,5 » » Cl Na » 5 » » $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$
- 3) 2,5 » » Cl Na » 10 » » $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$
- 4) 2,5 » » Cl Na » 20 » » $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$
- 5) tal cual sin agregado de gel.

Después del agregado del ClNa y del gel se calentó 10 minutos a 60° C y se completó a 100 cm³ cada porción con H₂O destilada, se agitó y se filtró.

Se nota la influencia benéfica de la pre-digestión péptica (comparar Cuadro I con II de la página siguiente).

A pH 4 la influencia del gel no se nota; a pH 3,5, aunque la pérdida es igual al anterior pH la purificación mejora, si bien tampoco el gel no tiene ninguna influencia. A pH 3 hay destrucción elevada de

las antitoxinas llegando al 65 % total y también sin influencia del gel.

Ensayamos por último la influencia del $\text{Al}(\text{OH})_3$ a diferentes pH con resultados muy parecidos a los que acabamos de detallar.

CUADRO II

N°	pH	Unidades (cm³)	Purificación	Pérdida %
1	4,0	80	2,5	50
2	4,0	80	2,5	50
3	4,0	80	2,5	50
4	4,0	80	2,5	50
5	4,0	80	2,5	—
1	3,5	80	4,7	50
2	3,5	80	6,3	50
3	3,5	80	5,0	50
4	3,5	80	4,2	50
5	3,5	100	6,3	40
1	3,0	60	4,7	65
2	3,0	60	3,2	65
3	3,0	70	3,6	60
4	3,0	—	—	—

La pérdida con $\text{Al}(\text{OH})_3$ se eleva a pH 3 al 64 % de las antitoxinas presentes y la relación de purificación llega a 4 veces.

Ensayos con sueros concentrados por proteolisis (Parfentjev). — El suero empleado contenía 1800 U. A. por cm³ y 11,37 % de proteínas, y fué obtenido por proteolisis péptica seguida de una ultrafiltración.

CUADRO III

Temperatura	Tiempo (minutos)	Unidades (por cm³)	Pérdida %	Purificación	Unidades/gramo de proteína
52°	10	200	33	2,7	42.600
52°	20	150	50	2,25	35.500
52°	30	150	50	2,40	38.000
52°	60	150	50	2,40	38.000
58°	10	120	60	2,45	39.000
58°	20	120	60	2,70	42.500
58°	30	100	66	2,27	36.000
58°	60	80	73	2,00	31.600
Original (1+4)	—	300	—	—	15.800

Estudiamos la influencia de la temperatura y del tiempo de calentamiento sobre estos sueros proteolizados en ausencia de pepsina, llevando el suero a pH 4,1 agregando 0,2 % de tricresol y 5 % de ClNa.

Después de la termocoagulación se diluye el suero con 4 partes de agua, se agita y se filtra, analizando los filtrados.

En el Cuadro anterior se puede observar la influencia de la temperatura y tiempo de calentamiento en la termocoagulación.

La purificación lograda en este ensayo con sueros proteolizados es buena, pues se llega con una pérdida en general del 50 % del valor antitóxico y una purificación de 2,5 veces.

El suero proteolizado daba una relación U. A./proteínas de 15.800 y pasaba después de la termocoagulación a un valor aproximado de 40.000 unidades. La temperatura influye en estos sueros proteolizados por el método de Parfentjev y a 58° C una gran parte de las proteínas son coaguladas, y esta coagulación no es reversible. Si en vez de calentar el suero a 58° C, lo hacemos a 52° C durante 10 minutos en las condiciones descritas anteriormente (Cuadro III) recuperamos el 66 % de las antitoxinas llegando a obtener 42.600 unidades por gramo de proteínas. Esta temperatura y tiempo de calentamiento parecen ser las óptimas para disociar las proteínas antitóxicas de las que no lo son.

Estos resultados nos indican que en los sueros proteolizados por Parfentjev las proteínas antitóxicas han sufrido una modificación y resisten a la temperatura de la experiencia. Las otras proteínas se separan fácilmente por el solo calentamiento durante 10 minutos a 52° C. Como se pudo ver además esta diferencia en una segunda proteolisis no se modifica en forma neta conservando las proteínas su estado físico anterior. Si calentamos un suero antitóxico (no proteolizado) compuesto de euglobulinas y pseudoglobulinas y obtenidos por los métodos clásicos de concentración no conseguimos a ninguna temperatura mejorar la relación U. A./globulinas, como lo hemos podido comprobar experimentalmente calentando por etapas estos sueros entre 50 y 70° C.

Hicimos otra serie de ensayos sobre la influencia del calentamiento en los sueros purificados por proteolisis péptica utilizando un suero que contenía 3.000 U. A./cm³ y 6,69 % de proteínas y llevando a pH 4 con ácido cítrico y 5 % de ClNa. Por calentamiento durante 10 minutos a 52°-53° C con una pérdida de 35-40 % dió 81.000 unidades por gramo de proteínas. El suero originario proteolizado daba 45.000 unidades.

Estudiamos el efecto de la pepsina en la termocoagulación agregándole al suero proteolizado (1.800 U. A./cm³, 11,57 % proteína) pepsina y luego termocoagulando.

El suero fué llevado a pH 4,1 con ácido cítrico, se le agregó 2^o/₀₀ de pepsina, 0,2 % de tricresol y 5 % de ClNa. Después de la termocoagulación se diluyó en 4 partes de agua.

CUADRO IV

Temperatura	Tiempo (minutos)	Unidades (cm ³)	Pérdida	Relación purificación	U. A./gramo
52°	10	200	33 %	1,8	28.400
52°	20	150	50 »	1,69	26.700
52°	30	150	50 »	1,69	26.700
52° y 58°	50 y 15	no flocula no contiene unidades	—	—	—

La pepsina, como se puede ver en el Cuadro anterior, no mejora en la relación unidades/proteínas.

Estos nos indica que los sueros obtenidos por proteolisis (Parfentjev) pueden ser aún purificados por una termocoagulación en las condiciones que nosotros experimentamos, pero que un nuevo agregado de pepsina no influye y por lo tanto no mejora la relación de purificación. En el último ensayo del Cuadro IV calentamos el suero primero 50 minutos a 52° C y luego 15 minutos a 58°, destruyéndose totalmente las unidades, y para terminar esta parte estudiamos la influencia del tricresol y ClNa en la termocoagulación de los sueros proteolizados. Empleamos para esto un suero concentrado por proteolisis y ultrafiltración que contenía 1.000 unidades por cm³ y cuya relación U. A./proteínas era de 20.000 unidades.

En el Cuadro que damos a continuación figuran los resultados obtenidos; todas las muestras se calentaron durante 10 minutos a 52-53° C., pH 4, luego se le agregó 4 partes de H₂O, se agitó y se filtró. (Cuadro V, página siguiente).

Como hemos dicho anteriormente el suero proteolizado originario daba una relación de 20.000 U. A./gramo de proteína, y por el Cuadro V se ve que conviene hacer la termocoagulación con menos ClNa que en el ensayo 1. Con 2,5 % de ClNa se obtiene una buena relación de purificación, pues se pasa de 20.000 a 38.000 unidades. La pérdida de unidades antitóxicas no pasa del 40-50 % del valor origi-

nario. También buena purificación se obtiene con ClNa al 5 % pero sin tricresol (ensayo suero 2).

CUADRO V

Suero Nº	Cl Na %	Tricresol %	Purificación	Pérdida %	Relación U. A./Proteínas
1	5	0,2	1,4	50	28.000
2	5	—	1,9	40	38.000
3	—	0,2	1,7	40	34.000
4	1	0,2	1,7	40	34.000
5	2,5	0,2	1,9	40	38.000

Concluyendo esta parte del trabajo podemos decir que por el método de Parfentjev se purifican los sueros alrededor de 3 veces con sólo una pérdida del 15-20 % de las unidades antitóxicas primitivas. Si estos sueros proteolizados los sometemos a una termocoagulación a 52-53° en presencia de ClNa se consigue aún una purificación mayor, como se ve por las experiencias realizadas. Esta purificación es de 2 veces con una pérdida del 40 % de las unidades antitóxicas primitivas. Conseguimos en total, por lo tanto, aplicando estos dos métodos combinados, como lo hace Pope, una purificación final de 5 veces con una pérdida total de más o menos el 50 % de las unidades antitóxicas primitivas.

El suero anterior daba originariamente 7.000 U. A./gramo de proteína y después de la proteólisis péptica llegaba a 20.000 unidades, y por último después de la termocoagulación a 38.000 unidades por gramo de proteína.

Ensayos con sueros nativos (antidiftéricos).— En estos experimentos ensayamos sueros de sangrías recientes. Comenzamos por ensayar la influencia del ácido en la proteólisis péptica, se usó HCl, ácido oxálico y ácido cítrico.

A igual pH existe una influencia marcada, pues con HCl se obtiene una purificación menor que con ácido oxálico y con este último menor que con ácido cítrico. Las experiencias que detallamos a continuación nos revelan estas diferencias.

Usamos un suero de 500 U. A. por cm³ que lo llevamos con HCl a pH 4,1, le agregamos 1 % de pepsina, 5 % de ClNa y 0,2 % de tricresol. Usamos 10 cm³ de esta mezcla y después de la termocoagulación se le agregó 40 cm³ de agua, se agitó y filtró rápidamente (pre-digestión péptica 2 h. 40° C.).

CUADRO VI

Temperatura	Tiempo (en minutos)	Unidades (cm ³)	Pérdida %	Relación de purificación
58°	10	80	36	1,6
58°	20	80	36	1,9
58°	30	80	36	2,1
58°	60	80	36	2,45
58°	120	60	52	2,40
Original (1+4)	—	125	—	—

Se nota la influencia del tiempo de calentamiento, llegando a una purificación de 2,4 a los 60 minutos y permaneciendo luego constante. Con ácido oxálico al mismo pH se llega a una purificación de 3,1 a igual temperatura y tiempo. Con ácido cítrico a pH 4,1 conseguimos una relación de purificación de 4 veces con una pérdida del 30 %.

Además de todos los factores que estudiamos en estas experiencias influyen el suero utilizado, tanto en la purificación como en la pérdida del valor antitóxico.

Influencia del ClNa y SO₄Na₂ en la coagulación por el calor. — Empleamos un suero antidiftérico (400 U. A./cm³) que proteolizamos a pH 4,0 con pepsina 2‰, durante 6 horas a 47° C. Luego le agregamos SO₄Na₂ o ClNa en las cantidades indicadas en el Cuadro que va a continuación y termocoagulación a 60° C durante 10 minutos. En esta forma se consigue una purificación comprendida entre 3 y 4 veces.

CUADRO VII

Observaciones	U. A./cm ³	Purificación	Pérdidas %
100 cm ³ de suero 0,2 cm ³ Tricresol	280	3,5	30 ⁽¹⁾
100 » » » 0,2 » » 2 % ClNa	230	3,6	43
100 » » » 0,2 » » 5 » ClNa	200	3,5	50
100 » » » 0,2 » » 10 » ClNa	200	3,9	50
100 » » » 0,2 » » 2 » SO ₄ Na ₂	350	3,6	12
100 » » » 0,2 » » 5 » SO ₄ Na ₂	350	3,9	12
100 » » » 0,2 » » 10 » SO ₄ Na ₂	300	3,7	25
100 » » » 0,2 » » 13 » SO ₄ Na ₂	200	3,7	50

⁽¹⁾ Sin tomar en cuenta la pérdida por volumen del floculado.

Estudiando los filtrados se observa que con ClNa al 5 % y 10 % se obtiene una pérdida del 50 % de las unidades antitóxicas llegándose a una purificación de más o menos 3,5 veces.

Con SO_4Na_2 , en cambio, operando al 2-5 % sólo se pierden el 12 % de las unidades y se consigue una purificación de 3,6-3,8 veces. Agregando mayores cantidades de SO_4Na_2 (10-13 %) no se consigue mejorar la relación de purificación y aumenta la pérdida de unidades. Ensayos repetidos con diferentes sueros nos revelan que siempre en las condiciones anteriores con SO_4Na_2 obtenemos una purificación que oscila entre 3,5 y 4,5.

La pérdida de unidades con esta sal es siempre menor que la obtenida con ClNa en la termocoagulación.

Este método puede utilizarse en la rutina para concentraciones de grandes volúmenes de sueros, pues es una técnica fácil y rápida, que puede ser completada agregando SO_4Na_2 después de la termocoagulación hasta precipitación de las globulinas totales (22 %) y diálisis final.

Proteolisis de sueros nativos en presencia de ClNa , SO_4Na_2 , gel $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$ y albúmina de huevo. — Nos interesaba conocer la influencia de estas sustancias en la proteolisis péptica del suero antidiftérico para estudiar las relaciones de purificación y la pérdida obtenida y compararlas con los métodos ya descriptos.

Además del ClNa y SO_4Na_2 ensayamos el gel $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$ obtenido según la técnica de Utkin y ya descrito en trabajos anteriores. Se ensaya la influencia en la proteolisis péptica de la albúmina de huevo, pues acelera este coloide los procesos enzimáticos.

Para realizar estas operaciones empleamos un suero antidiftérico de 500 U. A./ cm^3 que se llevó a pH 4,1 con ácido cítrico al 20 %.

A un litro de este suero le agregamos 4 gr. de pepsina (P. D. 1/10.000) y se repartió en porciones de 200 cm^3 cada una. A la primera porción se le agregó 10 gr. de ClNa , a la segunda 27 gramos de SO_4Na_2 seco y anhidro, a la tercera 10 cm^3 de albúmina de huevo y a la cuarta 50 cm^3 de gel $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$, dejando la quinta porción tal cual. Se pusieron luego a digerir en baño-maría durante 6 horas a 46° C. Luego de esta operación a la mitad de las muestras anteriores (100 cm^3) se le agregó 0,2 cm^3 de tricresol y se calentó a 58° durante 10 minutos. Así pudimos estudiar la purificación, después de la proteolisis y después de la termocoagulación. (Cuadro VIII, pág. sig.).

La proteolisis en presencia de las sustancias estudiadas sólo es conveniente en el caso del SO_4Na_2 , pues se consigue una purificación de 3,5 veces, que pasa a 4,5 después de la termocoagulación pero con una pérdida del 50 % de las unidades antitóxicas presentes.

La albúmina de huevo influye desfavorablemente pues sólo se consigue una purificación de 1,6 veces, en cambio con suero solo la purificación es de 2 veces. El gel $(\text{PO}_4)\text{Ca}_3$ no mejora tampoco la relación de purificación. La pérdida de unidades obtenida en este experimento con SO_4Na_2 se debe a la precipitación total de las euglobulinas, pero si operamos con SO_4Na_2 al 10 % la pérdida se reduce al 25 %.

CUADRO VIII

Nº	Observaciones	U. A. (cm³)	Purificación	Influencia termocoagulación (purificación)
1	Cl Na 5 %	375	3,0	4,2 — 3,0 = 1,2
2	SO_4Na_2 13,5 %	345	3,5	4,5 — 3,5 = 1,0
3	Albúmina de huevo 5 % . .	360	1,6	2,45 — 1,6 = 1,85
4	Gel $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$ 25 %	360	2	2,52 — 2 = 0,52
5	Control (sin nada)	375	2	—
1,	Termocoagulación del 1 . . .	270	4,2	—
2,	» » 2	240	4,5	—
3,	» » 3	315	2,45	—
4,	» » 4	270	2,52	—

c) *Influencia del pH en la termocoagulación de los sueros nativos.* — Además del pH se estudia la influencia conjunta del ClNa en la termocoagulación.

Los sueros fueron protelizados con pepsina al 2 ‰ a pH 3,5 durante una hora a 47° C. Luego llevados al pH indicado en el Cuadro a continuación y calentándolos a 60° C durante 10 minutos.

CUADRO IX

Suero Nº	pH	U. A./cm³	Purificación	Cl Na %
1	3,5	60	3,0	5
2	3,5	60	3,4	5
3	4,1	60	3,4	5
4	4,1	60	3,4	5
5	4,6	60	—	5
6	4,6	60	2,3	5
7	3,5	60	3,4	10
8	3,5	60	3,4	10
9	4,1	60	4,1	10
10	4,1	60	4,7	10
11	4,6	60	2,6	10
12	4,6	60	2,3	10

El pH óptimo para la termocoagulación es 4,1 llegándose a purificar hasta 4 veces. La pérdida en estos experimentos llega a ser del 50 % de las antitoxinas primitivas.

A un pH más bajo la purificación es menor y no pasa de 3 veces. Podemos decir como resultado de esta experiencia que el pH óptimo para la termocoagulación se encuentra alrededor de 4.

d) *Influencia de los antisépticos en la termocoagulación de los sueros nativos.* — Estudiamos la influencia del tricresol, ácido fénico, benzol, xilol toluol y timol en la termocoagulación de los sueros nativos.

El suero se llevó a pH 4,0 con ácido cítrico al 20 %, se le agregó 2 ‰ de pepsina y se calentó a 47° durante 45 minutos.

Luego se le agregó 5 % de ClNa y 0,2 % del antiséptico, se calentó 10 minutos a 60° y se filtró, analizando los filtrados.

CUADRO X

Suero Nº	U. A./cm ³	Pérdida %	Purificación	Antiséptico
Original	570	—	—	Nada
1	330	42	3,9	Nada
2	300	48	4,6	Tricresol
3	300	48	4,6	Acido fénico
4	330	42	3,8	Benzol
5	300	48	3,5	Xilol
6	300	48	3,9	Toluol
7	250	56	4,1	Timol

Únicamente el tricresol y el ácido fénico ejercen influencia benéfica en la termocoagulación: los otros antisépticos ensayados no influyen.

e) *Influencia del tiempo de digestión en la termocoagulación de los sueros nativos.* — Empleamos un suero que contenía 650 U. A./cm³, lo llevamos a pH 3,5 con ácido cítrico. y le agregamos pepsina en la proporción de 1,5 g por cada 350 cm³ de suero.

Se llevaron los sueros a la estufa a 37°, dejándolos el tiempo indicado en el Cuadro que va a continuación. Luego se termocoaguló, calentándolo a 60° durante 10 minutos, previo agregado de 5 % de ClNa. Después se le agrega igual volumen de agua, se agita y se filtra.

CUADRO XI

Suero N°	Tiempo de proteolisis	U. A./cm ³	Pérdida %	Purificación
1	60 minutos	175	40	3,4
2	3 horas	175	40	4,0
3	24 »	175	40	4,0
4	144 »	125	57	4,2

Después de 60 minutos (ver Cuadro XI) el tiempo de proteolisis no influye y pasando sólo de 3,4 a 4,0 veces la purificación.

Ensayos recientes nos demuestran que la proteolisis pépsica puede aún reducirse mucho sin que desmejore la relación de purificación.

f) *Influencia de la dilución y ClNa en la termocoagulación de los sueros nativos.* — El suero antidiftérico de 650 U. A./cm³ se lleva con ácido cítrico a pH 4,0. Se le agrega 4 ‰ de pepsina y se deja 60 minutos a 49° C. Luego lo dividimos en porciones de 50 cm³ y le agregamos ClNa al 5,10 y 20 ‰, calentándolas 10 minutos a 60°, luego se le agregó agua en las condiciones especificadas en el Cuadro que va a continuación.

CUADRO XII

Suero N°	H ₂ O agregada	Pérdida %	Purificación	Cl Na %
0	—	48	5,8	—
1	38 cm ³	30	4,0	5
2	114 »	29	3,3	5
3	38 »	30	4,2	10
4	114 »	29	3,9	10
5	38 »	30	4,2	15
6	114 »	29	3,9	15
7	38 »	47	3,5	20
8	114 »	36	3,5	20

La mayor purificación se ha obtenido sin agregado de agua, llegándose con este suero a una purificación de 5,8 pero con una pérdida de casi el 50 % de las unidades primitivas.

Agregando agua después de la termocoagulación y filtrando la pérdida disminuye no pasando en muchos experimentos del 30 ‰.

La purificación es mejor diluyendo con una parte de agua que diluyendo con 3 partes de agua. No se nota la influencia del ClNa en la purificación en las condiciones experimentadas.

Purificación de sueros concentrados. — Empleamos en estos ensayos sueros concentrados (euglobulinas, más pseudoglobulinas) obtenidos por precipitación con SO_4Na_2 al 22% y separación del exceso de SO_4Na_2 por cristalización en la cámara fría. Se eligieron dos sueros diferentes, el número 2067 con 1.000 U. A./ cm^3 y el número 2044 con 1.700 U. A./ cm^3 .

La digestión péptica se realizó diluyendo el suero con dos partes de agua de manera que el contenido proteico final fuera de más o menos el 7 %. La proteólisis péptica se hizo a pH 3,1 y a pH 3,7 y a 46° durante 45 minutos. A este último pH la pérdida se reduce al 20 % de las unidades antitóxicas.

Las termocoagulaciones se hicieron a pH 4,1-4,6 a 60° C durante 10 minutos, previo agregado de 5 % de ClNa .

CUADRO XIII

Suero Nº	pH (termocoagulación)	Purificación	Pérdida %
2044	4,1	4,7	40
2044	4,5	4,5	40
2067	4,1	4,5	40
2067	4,6	4,0	40

En estos sueros concentrados previamente por el método salino y luego proteolizados a pH 3,1 con pepsina y luego termocoagulados a los pH indicados en el Cuadro anterior, la purificación es más o menos 4,5 y la pérdida de 40 % en todos. Esta pérdida la podemos reducir al 20 % si proteolizamos a pH 3,7 en la forma que indicamos a continuación.

El suero 2067 se lleva a pH 3,7 con ácido cítrico al 20 %, proteolizando con pepsina al 2 ‰, calentando 45 minutos a 46° C. Después de esta operación se lleva a pH 4,3-4,4 agregando 5 % de ClNa al 1) y 5 % de ClNa y 0,2 ‰ de tricresol 2).

Calentamos 1) y 2) durante 10 minutos a 60° C y filtramos. Los filtrados dieron una purificación de 3,5 el 1) y de 5,1 el 2) y sólo una pérdida del 20 % de las unidades antitóxicas. Este experimento lo repetimos varias veces con iguales resultados pudiendo utilizarse en la rutina para purificar sueros en gran escala con una pérdida que no pasa del 20 %.

Este procedimiento consistiría en concentrar los sueros por el método salino, luego proteolizarlos con pepsina a pH 3,7-4,0 durante 1 hora y por último termocoagularlos a pH 4,3-4,4. Se puede el final volverlos a precipitar con SO_4Na_2 al 22 % y dializarlos.

En vista del buen resultado obtenido por este último procedimiento ensayamos aplicar este método al suero nativo sustituyendo el CINa por el SO_4Na_2 y trabajando con un volumen considerable de suero.

El método que seguimos consistió en proteolizar el suero diluido al $\frac{1}{2}$ con H_2O a pH 4,0 con 2 ‰ de pepsina. La digestión duró 90 minutos a 46° C. Luego le agregamos SO_4Na_2 10 H_2O de manera que la concentración final fuera de 7,5 % calculado en SO_4Na_2 . También le agregamos por cada 10 litros de suero diluido al $\frac{1}{2}$ con H_2O destilada, 10 cm^3 de tricresol disuelto en 30 cm^3 de agua. Después se termocoaguló el suero durante 10 minutos a 60° filtrándolo inmediatamente. El filtrado fué llevado a pH 7,4 con NaOH al 40 % agregando SO_4Na_2 en cantidad suficiente para alcanzar la concentración del 22 %. El precipitado lavado con SO_4Na_2 al 25 % y dializado hasta eliminación del exceso de sulfato. Con este procedimiento se consiguió una purificación de 4,6 veces. Como trabajamos con 2,8 millones de unidades y finalmente recuperamos 2,0 millones, este método da una pérdida del 30 % de las unidades antitóxicas.

En otros ensayos realizados recientemente logramos reducir esta pérdida que no pasa de 20 % con una purificación que está comprendida entre 4-5 veces. (En general es muy variable y depende del suero).

Separación de las albumosas formadas durante la proteolisis péptica.

— Uno de los problemas planteados por estos métodos proteolíticos para purificar los sueros antitóxicos era la eliminación de las albumosas tóxicas para el organismo humano.

El único método que usábamos hasta el presente era la ultrafiltración (U-filtración), técnica que resulta larga y difícil cuando se trata de purificar grandes cantidades de sueros.

Con el objeto de evitar este procedimiento estudiamos sistemáticamente la influencia de los ácidos, sales y sustancias orgánicas y pudimos comprobar al final que lo que mejor resultado daba, era el agregado de alcohol etílico en la proporción del 10 % al suero proteolizado, consiguiendo en esta forma eliminar la mayor parte de las albumosas, pues no precipitaban con SO_4Am_2 a $\frac{1}{2}$ saturación.

Con este objeto empleamos el U-filtrado de un suero antidiftérico proteolizado empleando la técnica de U-filtración de Quigley. Pro-

teolizábamos suero antidiftérico con pepsina a pH 4, en baño-maría a 47° C durante 24 horas. Luego llevamos el suero a pH 5,5 y se adsorbía con $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$ obtenido según la técnica de Utkin. Centrifugamos o filtramos y el líquido luego era U-filtrado, recogiendo los U-filtrados.

Estos U-filtrados eran ricos en albumosas y nos servían para los ensayos de separación.

Influencia del pH (HCl o NaOH).

CUADRO XIV

U-filtrado volumen	HCl o NaOH agregado (cm ³)	pH	Aspecto
60	10 HCl n	1,4	O
60	5 »	3,1	O
60	1 »	4,8	O
60	10 NaOH n	12	+ + +
60	5 »	11,8	+ + +
60	1 »	8,0	+ + +
60	3 »	9,8	+ + + + + +
60	3 »	9,5	+ + + + + + +
60	2 »	8,4	+ + +

El cuadro anterior nos indica que el máximo de estabilidad de las albumosas se encuentra en la zona ácida de pH 1,4 a 4,8 y que el mínimo de estabilidad se encuentra en la zona alcalina y alrededor de pH 9,5.

Las determinaciones del pH se hicieron con el potenciómetro de Leeds y Nurhtrup y electrodo de vidrio (Holder).

A continuación estudiamos la acción del alcohol y de la acetona en estos U-filtrados ricos en albumosas y llevados previamente a pH 1,5-12,1-7,4 y 3,1.

CUADRO XV

U-filtrado Volumen	Alcohol (cm ³)	Acetona	Aspecto pH 1,5	Aspecto pH 12,1	Aspecto pH 7,4	Aspecto pH 3,1
5	2,5	—	O	O	O	O
5	5	—	débil op.	++	O	O
5	10	—	ppdo. ++	+++	op. +	O
5	20	—	m. ppdo. +++	+++++	ppdo. +++	ppdo. ++
5	—	2,5	O	O	O	O
5	—	5	O	O	O	O
5	—	10	ppdo. ++	opalesc.	opalesc.	opalesc.
5	—	20	ppdo. +++	ppdo. +++	ppdo. +++	ppdo. +++

La acción precipitante es mayor a pH 12,1 con alcohol que a pH 1,5. La acetona tiene una acción precipitante menor que el alcohol y el pH influye poco.

Si al U-filtrado a pH 1,5 le agregamos suero antidiftérico y por cada volumen medio volumen de alcohol, precipita el suero antidiftérico que se redisuelve perfectamente de nuevo si se tiene la precaución de hacer esta operación a 0° C. Como sabemos por el ensayo anterior a este pH no precipitan las albumosas siendo por lo tanto un método de separación de las albumosas del suero antitóxico proteolizado.

A pH 4,7 y pH 3,1 volúmenes iguales de mezclas de U-filtrado y suero antidiftérico precipitan y como a estos pH con el volumen de alcohol utilizado no precipitan las albumosas, también sería un método de separación de las albumosas de las proteínas antitóxicas.

Redisolución del precipitado obtenido. — Hicimos 2 ensayos, el primero con alcohol (a) y el segundo con acetona (b): a 90 cm³ de U-filtrado se le agregó 10 cm³ de suero antidiftérico de 1.000 U. A. por cm³ y se llevó a pH 2 con HCl. Se dividió en dos porciones agregándole a la primera porción (50 cm³) 25 cm³ de alcohol y a la segunda porción 25 cm³ de acetona. Esta operación se hizo a 0° C centrifugando rápidamente.

a) El precipitado se solubiliza en ClNa al 9 ‰ que se lleva a pH 8. Esta solución es límpida y el valor antitóxico originario se recupera en una proporción del 80 %.

b) El precipitado también se redisuelve en ClNa al 9 ‰ en medio débilmente alcalino. La recuperación de las antitoxinas es igual a la del ensayo anterior.

Hemos usado en estos experimentos concentraciones de alcohol o acetona que de acuerdo a los ensayos descritos no precipitaran las albumosas.

Repetimos este ensayo mezclando partes iguales de suero con líquido de U-filtraciones pero en esta forma el precipitado se redisuelve difícilmente después de su precipitación con alcohol o acetona.

De manera, pues, para separar las albumosas por este método es necesario diluir el suero después de su proteolisis 10 veces, llevarlo a pH 2 (a 0° C) y agregar por cada volumen de esta solución 1/2 volumen de acetona o alcohol.

Por diálisis no es posible separar las albumosas de la fracción antitóxica.

Estudiamos también diferentes sales utilizables para esta separación. El ClK, el ClNa, NO_3Na , acetato de sodio a saturación precipitan las albumosas y las antitoxinas al mismo tiempo. El SO_4Na_2 al 22 % precipita también gran parte de las albumosas; en cambio el SO_4Am_2 a $1/2$ saturación sólo precipita una pequeña proporción de las albumosas. El pH del medio influye siendo mínima la precipitación a pH 7,2-7,4.

La temperatura también influye precipitando menos albumosas a 0°C .

Combinación de la precipitación del suero proteolizado con SO_4Am_2 a $1/2$ saturación y alcohol etílico. — No encontramos ninguna sal que agregada al U-filtrado (rico en albumosas) no diera opalescencia con SO_4Am_2 a $1/2$ saturación. En cambio evitamos la precipitación de las albumosas de los U-filtrados, agregando a estos líquidos 20 % de alcohol.

En esta forma con SO_4Am_2 a $1/2$ saturación ni precipitan ni a las 24 horas de contacto las albumosas.

Por otra parte pudimos comprobar que el suero antidiftérico que contenía el 20 % de alcohol precipitaba con SO_4Am_2 a media saturación y el precipitado se redisolvió.

Desgraciadamente a esta concentración alcohólica se pierden unidades antitóxicas, pues los filtrados de los distintos ensayos nos dieron siempre más del 20 % de las unidades totales. Para reducir esta pérdida disminuimos la cantidad de alcohol agregada conviniendo en emplear concentraciones del 10 % que a 0° y a pH 7,2-7,4 sólo dan con SO_4Am_2 a $1/2$ saturación una debilísima opalescencia debida a las albumosas.

En el protocolo que damos a continuación informamos sobre la medida del valor antitóxico en ensayos comparativos de sueros proteolizados y precipitados en SO_4Am_2 a $1/2$ saturación y en la misma forma pero con 10 % de alcohol y acetona.

1) 500 cm^3 de suero proteolizado más 500 cm^3 de solución saturada de SO_4Am_2 , lavando el precipitado con SO_4Am_2 $2/3$ de saturación (3 volúmenes en SO_4Am_2 saturado más 2 volúmenes de H_2O). Luego el precipitado fué disuelto y llevado a un volumen conocido.

2) 500 cm^3 del mismo suero proteolizado más 50 cm^3 de acetona más 550 cm^3 de solución saturada de SO_4Am_2 y lavando en la forma anterior el precipitado, se disuelve en agua.

3) 500 cm^3 del suero proteolizado más 50 cm^3 de alcohol y luego precipitado con 550 cm^3 de una solución saturada de SO_4Am_2 y redisoluelto en agua. (Lavando el precipitado en la forma anterior).

Medimos en los 3 filtrados anteriores 10 y 1 U. A. por el método de Ehrlich comprobando que los filtrados correspondientes al líquido con $\text{SO}_4 \text{Am}_2$ solo y con $\text{SO}_4 \text{Am}_2$ más alcohol contenían menos de 1 U. A. Con acetona y $\text{SO}_4 \text{Am}_2$ nos daba 1 U. A. Como el suero primitivo contenía 200 U. A. podemos decir que prácticamente no ha habido pérdida de unidades antitóxicas en los filtrados.

El precipitado globulínico obtenido en 3) se redisuelve también como el 1). El suero proteolizado antes de precipitarlo con $\text{SO}_4 \text{Am}_2$ saturado se lleva a pH 7,2-7,4.

Para comprobar el experimento anterior y descartar la influencia del $\text{SO}_4 \text{Am}_2$ en la medición de las unidades antitóxicas, los líquidos fueron dializados obteniéndose la confirmación de los valores anteriores.

Por otra parte los precipitados globulínicos fueron medidos encontrando igual valor antitóxico en los tres.

Determinamos en las 3 soluciones globulínicas la relación entre las unidades antitóxicas y el contenido proteico total. Con este objeto, determinamos separadamente la cantidad de sulfato de amonio separando las proteínas totales por precipitación con ácido tricloroacético y tungstato de sodio. Aparte determinamos por el método corriente el extracto total a 105°C . Por diferencia calculamos el contenido proteico.

A continuación damos los valores obtenidos:

$$1) \text{ Precipitación con } \text{SO}_4 \text{Am}_2 \frac{2300}{0,147} = 15.300$$

$$2) \text{ Precipitación con } \text{SO}_4 \text{Am}_2 \text{ más alcohol: } \frac{2300}{0,125} = 18.500$$

$$3) \text{ Precipitación con } \text{SO}_4 \text{Am}_2 \text{ más acetona: } \frac{2300}{0,134} = 17.000.$$

Estos valores nos indican claramente que la precipitación combinada con $\text{SO}_4 \text{Am}_2$ más alcohol o acetona da un precipitado más puro (una purificación mayor) que precipitando los sueros proteolizados con $\text{SO}_4 \text{Am}_2$ solo. Esto se debe al hecho que parte de las sustancias proteolizadas precipitan con $\text{SO}_4 \text{Am}_2$ y esta precipitación se evita por el agregado de alcohol o acetona al 10 %. La relación U. A./proteína en los tres experimentos anteriores es baja debido a que se partió de un suero de poco valor antitóxico.

BIBLIOGRAFIA

1. PARFENTJEV. United States Patent Office, N° 2065. 196/22. Diciembre 1936.
2. MODERN, F., y RUFF, G. *B. Zeitschr.*, t. 299, pág. 377, año 1938.
3. WEIL, A. J.; PARFENTJEV, A., y BOWMAN, K. L. *The Journ. of Imm.*, t. 35, pág. 399, año 1938.
4. MODERN, F., y RUFF, G. *Rev. Soc. Arg. Biol.*, Vol. XV, N° 3, pág. 108, año 1939.
5. MODERN, F., y RUFF, G. *Rev. Soc. Arg. Biol.*, Vol. XV, N° 3, pág. 125, año 1939.
6. HANSEN, A. *Bioch. Zeitschr.*, t. 299, pág. 363, año 1938.
7. POPE. *Brit. Journ. exper Path.*, t. 19, pág. 245, año 1938.
8. POPE. *Brit. Journ. exper Path.*, t. 120, pág. 201, año 1939.
9. SANDOR. *C. R. de la Soc. de Biol.*, t. 80, pág. 840, año 1939.
10. SANDOR, G. *C. R. de la Soc. de Biol.*, t. 80, pág. 1187, año 1939.
11. POPE y HEALEY. *Brit. Journ. exper Path.*, t. 20, pág. 213, año 1939.
12. MODERN y WERNICKE. *Anales Asociación Química*, t. 18, pág. 47, año 1930.