

Las fracciones proteicas del suero como antígenos diferentes

Por I. PIROSKY

I

GLOBULINAS

La diferente naturaleza antigénica de las suero-globulinas no ha podido ser demostrada en forma inequívoca.

Para SOERENSEN¹ toda solución de globulina obtenida por dilución y precipitación por sales, aun la que se considera mejor purificada, presenta cualidades de compuesto disociable, pudiendo de la fracción Euglobulina separar Pseudo y de ésta obtener siempre Euglobulina. Además, la disminución de solubilidad de la Pseudoglobulina a consecuencia de su preparación, hace más difícil el problema. (Esta alteración de solubilidad es considerada por SOERENSEN como una desnaturalización y por CHICK² como transformación de Pseudo en Euglobulina).

El análisis biológico, mediante el shock anafiláctico, de las globulinas fraccionadas por sales, tampoco ha evidenciado diferencias netas y constantes. (GAY y ADLER³, DOERR y RUST⁴, DALE y HARTLEY⁵, y DOERR y BERGER⁶). SUÁREZ⁷, combinando los métodos de dilución, precipitación por sales y electroultrafiltración, obtiene fracciones específicas.

Por nuestra parte, intentamos disociar del total de globulina del suero normal de caballo, una fracción insoluble en agua electrodiálizada que no contuviera proteína soluble ocluida o combinada y otra soluble en dicho medio, privada de la fracción anterior.

Preparamos soluciones de globulinas (a), (b) y (c) de acuerdo a los métodos que se detallan más abajo, determinando su naturaleza antigénica, en esta oportunidad, por el shock anafiláctico.

Métodos de elaboración. — a) *Fraccionamiento por sulfato de amonio:*

Euglobulina: Suero $\frac{1}{10}$, se precipita al $\frac{1}{3}$ de saturación y reprecipita cuatro veces. El último ppdo. disuelto en agua destilada se diáliza hasta eliminación de sulfatos.

Pseudoglobulina: El primer filtrado de Euglobulina se completa a $\frac{1}{2}$ saturación. Esta operación se realiza dos veces, reprecipitando luego dos veces más a $\frac{1}{2}$ saturación. Estas soluciones tienen pH = 6.5. Se diáliza.

b) *Fraccionamiento por sulfato de amonio y electrodiálisis*: Las soluciones de Eu y Pseudo obtenidas según (a) y dializadas hasta $k = 10^{-4}$ se electrodializan con 220 volts hasta $k = 10^{-6}$.

Euglobulina: El ppdo. formado en el vaso del electrodializador después de decantado el líquido sobrenadante, se lava, durante el paso de la corriente, con agua destilada y solución de ClNa $n/1000$, tantas veces como sea necesario hasta que el líquido superior no acuse opalescencia con sulfato de amonio a $\frac{1}{2}$ sat. y el ppdo. no produzca espuma agitado en agua electrodializada.

Pseudoglobulina: Se considera como tal la proteína que permanece soluble a una conductibilidad del orden 10^{-6} . Se decanta el líquido durante el paso de la corriente.

c) *Fraccionamiento por sulfato de soda y electrodiálisis*:

Euglobulina: Se precipita el suero a 13,5 % con sulfato de soda anhidro a 37°C. El ppdo. es lavado con sulfato de soda al 14 % y reprecipitado cuatro veces previa cristalización de la sal a 0°C. Se dializa y electrodializa hasta $k = 10^{-6}$. Se decanta el líquido sobrenadante de electrodiálisis y el precipitado se lava como en el caso anterior.

Pseudoglobulina: El 1er. ppdo. de euglobulina se completa hasta 21,5 % a 37°C (pH de estos líquidos 7,8). El ppdo. es lavado, agitando, con solución de sulfato de soda a 22 % a fin de eliminar albúmina. Se reprecipita cuatro veces a la misma concentración llevando previamente una vez al 13,5 %. Disuelto el ppdo. final en agua destilada, se dializa y electrodializa hasta $k = 10^{-6}$, recogiendo por separado el ppdo. y el líquido sobrenadante.

Los ppdos. de Euglobulina se disuelven en solución de ClNa 3 % y a las soluciones de pseudo se añade ClNa al 1 %, llevando todos los líquidos a pH = 6,8. Se filtra por bujía, dosando nitrógeno por Kjeldahl.

Resultados del shock anafiláctico. — Sensibilizamos para cada solución series de 30 cobayos de 250 g por vía subcutánea con un miligramo de proteína. 21 a 30 días de incubación, desencadenando por vía venosa.

CUADRO N° 1
(Soluciones « a »)

| Cobayo N.º | Proteína Sensibilizante | Proteína Desencadenante | Dosis mgrs. | Observaciones |
|------------|-------------------------|-------------------------|-------------|------------------|
| 110 | Euglobulina « a » | Euglobulina « a » | 5 | + 2 ^m |
| 105 | » » | Pseudoglobulina « a » | 5 | + 2,50 |
| 164 | Pseudoglobulina « a » | » » | 5 | + 2 ^m |
| 166 | » » | Euglobulina « a » | 5 | + 2 ^m |

Las fracciones Eu y Pseudo preparadas según « a » no presentan especificidad.

CUADRO N° 2
(Soluciones « b »)

| Cobayo N.º | Proteína Sensibilizante | Proteína Desencadenante | Dosis mgrs. | Observaciones |
|------------|-------------------------|-------------------------|-------------|------------------|
| 122 D | Euglobulina « b » | Euglobulina « b » | 5 | + 2 ^m |
| 126 » | » » | Pseudoglobulina « b » | 10 | Shock-Sobrevive |
| 856 K | Pseudoglobulina « b » | » » | 5 | + 2 ^m |
| 854 » | » » | Euglobulina « b » | 10 | Shock-Sobrevive |

Los cobayos sensibilizados con las proteínas « b » tienen mayor sensibilidad a la globulina homóloga. La solución de Pseudoglobulina presenta, aún después de electrodiálisis prolongada, leve opalescencia con Sulf. de amonio al $\frac{1}{3}$ de saturación.

CUADRO N° 3
(Soluciones « c »)

| Cobayo N.º | Proteína Sensibilizante | Proteína Desencadenante | Dosis mgrs. | Observaciones |
|------------|-------------------------|-------------------------|-------------|------------------|
| 527 B | Euglobulina « c » | Euglobulina « c » | 5 | + 2 ^m |
| 531 > | > > | Pseudoglobulina « c » | 20 | — ¹ |
| 580 > | Pseudoglobulina « c » | > > | 5 | + 1,50 |
| 721 > | > > | Euglobulina « c » | 16 | — |

El shock se produce solo entre proteínas homólogas. El complejo Eu-Pseudo está suficientemente disociado como para obtener antígenos específicos.

Pseudoglobulina por Sulf. de amonio y Sulf. de soda. — La Pseudoglobulina obtenida por Sulf. de amonio entre el 33 y 50 % es un complejo (Ps-Eu) que se mantiene como tal a pesar del fraccionamiento repetido, diálisis y electrodiálisis. Si durante esta última operación se investiga la presencia de Euglobulina en la fracción soluble de Pseudo por la reacción del sulfato de amonio al $\frac{1}{3}$ de saturación puede observarse que la intensidad de la opalescencia disminuye con el tiempo pero que a su vez disminuye la concentración total de proteínas en solución.

Disociación del complejo Eu-Pseudo. — La fracción denominada Euglobulina precipitada por sulfato de soda, sulfato de amonio o por dilución al $\frac{1}{10}$ con agua saturada de CO₂ es siempre un complejo Eu-Ps. cuyo contenido en Pseudoglobulina decrece en el orden de los métodos citados. Los tres métodos permiten obtener una Euglobulina antigénicamente específica siempre que se agote su contenido en Pseudoglobulina. La facilidad con que se obtiene Eu antígeno específico está en relación directa con el contenido en Ps. del complejo Eu-Ps. Por eso, la fracción precipitada al 13,5 % con sulfato de soda que contiene gran cantidad de Pseudo, conviene reprecipitarla, después de dializada, con agua destilada saturada con CO₂, que si bien, a su vez, precipita un complejo Eu-Ps., su proporción de Pseudo es tan pequeña que permite un rápido agotamiento.

II

ALBÚMINA

DALE y HARTLEY⁵ establecieron que la fracción albúmina es antígeno sensibilizante y desencadenante, pero que a diferencia de las globulinas necesita mayor tiempo de incubación y mayor dosis, y que la especificidad sólo es neta entre albúmina y euglobulina.

Para nuestras experiencias hemos empleado soluciones de albúmina preparadas según los métodos de PAULI⁸ y HOWE⁹ este último completado con una electrodiálisis de 12 horas hasta $k = 10^{-5}$

Sensibilizamos 30 cobayos de 250 g con un miligramo por vía subcutánea — 35 días de incubación — desencadenando por vía venosa.

¹ Sobreviven sin ninguna manifestación.

CUADRO N° 4
(Albúmina por Sulf. de amonio)

| Cobayo N.º | Proteína Sensibilizante | Proteína Desensendeante | Dosis mgrs. | Observaciones |
|------------|-------------------------|-------------------------|-------------|------------------|
| 872 | Albúmina | Albúmina | 4 | + 2 ^m |
| 873 | > | Pseudo | 10 | — |
| 874 | > | Euglobulina | 15 | — |
| 130 | Euglobulina | Albúmina | 10 | — |
| 864 | Pseudo | > | 10 | — |

(Albúmina por Sulf. de soda)

| | | | | |
|-------|-------------|-------------|----|------------------|
| 727 | Albúmina | Albúmina | 5 | + 2 ^m |
| 736 | > | Pseudo | 15 | — |
| 734 | > | Euglobulina | 10 | — |
| 513 B | Euglobulina | Albúmina | 20 | — |
| 585 | Pseudo | > | 10 | — |

Las soluciones de albúmina obtenidas por ambos métodos son antígeno específicos frente a Eu y Pseudo. Comparativamente es más fácil obtener una albúmina específica por sulfato de soda, pues el método del sulfato de amonio requiere una electrodiálisis prolongada y repetidos tratamientos con sulfato de potasio $n/1000$ para que la reacción con sulfato de amonio a $\frac{1}{2}$ sat. sea negativa.

CONCLUSIONES

De las experiencias relatadas se deduce:

- 1º Es posible obtener dos globulinas de diferente naturaleza antigénica:
 - a) *Euglobulina*: ppda. por sulfato de soda, sulfato de amonio o CO_2 , siempre que se agote su contenido en globulina soluble.
 - b) *Pseudoglobulina*: ppda. por sulfato de soda entre 13,5 y 21,5 %.
- 2º La fracción albúmina es antígeno específico frente a Eu y Pseudoglobulina.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ SOERENSEN. *Studies on proteins*. VIII. *On the solubility of serum globulins*. «C. R. Trav. Lab. de Carlsberg», 1923-27, XV-XVI, 1-29 y XVIII, 1930.
- ² CHICK H. *The apparent formation of Euglobulin from Pseudo*. «Biochemical Journal», VIII, 1914, 404.
- ³ GAY et ADLER. *Journal Medical Research*, XIII, 1908, 433.
- ⁴ DOERR et RUSS. *Die identität der anaphylaktisierenden und der toxischen substanz artfremder sera*. «Zeitschr. f. Immunitätsf.», 1909-2, 109.
- ⁵ DALE et HARTLEY. *Anaphylaxis to the separated proteins of horse-serum*. «Biochemical Journal», X, 1916, 408.
- ⁶ DOERR et BERGER. *Immunologische Analyse der Komplexen Struktur der Serumeweisses*. «Zeitschr. f. Hygiene», 96, 1922, 191.
- ⁷ SUAREZ. *Investig. s/l'annafilaxie sérique*. «Annales de l'Institut Pasteur», 42, 1928, 876.
- ⁸ PAULI. *Über die Loesl. Beeinfl. schwerloesi. Kalks. durch Eiweis Koerper*. «Biochemische Zeitschr.», 1929, 71.
- ⁹ HOWE. *The use of sodium sulfate as the glob. precip. in the determ. of proteins in blood*. «Journal of Biological Chem.», 49, 1921, 93.