

Acción de las sales de diazonium sobre la toxina diftérica

Por I. PIROSKY y E. A. FRIEDHEIM (*)

La adición de sales de diazonium a un filtrado de cultivo en caldo de *C. diphtheriae* determina la formación de productos coloreados. Estos resultan de la combinación de dichas sales con la toxina y las proteínas inespecíficas contenidas en el caldo.

La acción que ejercen las sales de diazonium sobre la toxina diftérica puede apreciarse por las perturbaciones que experimentan los signos que la caracterizan « in vivo » e « in vitro ».

Estas modificaciones están condicionadas por: A- la relación diazo compuesto/*N* del filtrado; B- el pH de la reacción.

Hemos analizado la influencia de estos factores sobre los siguientes signos de la toxina: D.r.m. (dosis reactiva mínima), *L*₄, *L*_f y el valor antigénico (capacidad de inducir la formación de antitoxinas específicas por inoculación a los animales).

La toxina utilizada fué obtenida por cultivo de la cepa P.W. 8 en caldo-agua de carne-peptona; parcialmente purificada por precipitación fraccionada por sulfato de amonio y diálisis, contenía 11,1 gamas de nitrógeno por *L*_f.

Las sales de diazonium (**) utilizadas fueron aisladas al estado

(*) El Dr. FRIEDHEIM inició el estudio de este tema en Ginebra donde lo abandonara por falta de resultados. En ocasión de su permanencia en este Instituto, le propuse reiniciarlo considerando otros puntos de vista. — I. P. Este trabajo ha sido comunicado a las « Reuniones del personal del Instituto », el 22 de julio de 1941.

(**) MÉTODO DE PREPARACIÓN. — *Ácido p-diazobencensulfónico*. — Una solución al 12,5 % de un mol de sulfanilato de sodio conteniendo 1,2 mol de nitrito de sodio se mezcla a 5°C agitando rápidamente con 3,5 mol de ácido clorhídrico 3,5/*N* enfriado a 0°. El precipitado cristalino es separado por filtración, lavado con agua fría y recristalizado a 60°.

p-sulfamidodiazobencene. — Una solución al 20 % de un mol de nitrito de sodio es agregado agitando rápidamente a una solución al 12 % de un mol de sulfanilamida en dos mol de ácido clorhídrico *N*/10. La mezcla en reacción

sólido, desprovistas de ácido nitroso. Se ha estudiado en particular el efecto del ácido p-diazo bencensulfónico. Los compuestos p-sulfamida diazo bencene y p-nitro diazo bencene han sido examinados brevemente.

El compuesto azo-toxina se obtuvo por mezcla de la solución al 1% de la sal de diazonium y de la toxina. Ambos reactivos han sido enfriados previamente a 0° - 5°C. La toxina fué diluída con cantidades apropiadas de buffer de fosfato (o bicarbonato de sodio) a fin de evitar que el agregado de dosis crecientes de diazo compuesto pudiera influir sobre el valor del pH asignado para el experimento. La reacción — ejecutada a menos de 5°C — se manifiesta por la formación de un color rojo anaranjado y alcanza el límite en el término de 1/2 a 12 horas en relación con la cantidad de diazo compuesto añadido.

A. — RELACIÓN DIAZO COMPUESTO/N DEL FILTRADO

1. *Efecto sobre la D.r.m.* — Se determinó la menor dilución de cada azotoxina, que por inyección de 0,1 ml por vía intradérmica en el conejo, provocaba a las 48 horas la formación de un eritema. En cada conejo se tituló al mismo tiempo la d.r.m. de la toxina original. (De la misma muestra se prepararon las diferentes azotoxinas). La disminución de la toxicidad se expresa por un factor que resulta de la relación siguiente:

$$\frac{\text{d.r.m. azo-toxina}}{\text{Lf azo-toxina}} \cdot \frac{\text{Lf toxina}}{\text{d.r.m. toxina}}$$

La toxicidad disminuye en relación con la cantidad de diazo compuesto añadido a la toxina. A partir de una concentración útil, pequeños incrementos de diazo compuesto provocan grandes incrementos en la detoxificación. Un factor de detoxificación del orden 6.10^5 es provocado por cuatro veces la cantidad de diazo que determina un factor de 10^2 . (Tabla I, gráfico 1).

debe permanecer clara mientras se espera 10'. Fracciones alícuotas de la diazo solución son neutralizadas con bicarbonato de sodio; el precipitado es separado por filtración, lavado con un pequeño volumen de ácido clorhídrico N/10 enfriado y con agua fría; finalmente, redisoluto en el volumen calculado de ácido clorhídrico N/10. La solución es titulada con una solución standard de sal-R y ajustada a la concentración de 1%.

p-nitrodiazobencene. — El antidiazotato de sodio sólido fué preparado de acuerdo a SCHMIDT, B.27, 518, 1894. Se usa, previa filtración, una solución al 1% en ácido clorhídrico N/10.

TABLA I
Efecto de la concentración del diazo (p-diazobencensulfónico)
sobre la d.r.m. y Lf (pH: vecino a 7)

N°	Toxina	Diazo 1 %	Buffer pH 7.3	% diazo	pH	Ki/m	Lf	Factor detox
	c.c.	c.c.	c.c.					
1	30	0.84	14.2	.028	7.3	1	26	< 10
2	>	1.2	13.8	.04		1.5	>	> >
3	>	1.65	13.3	.055	7.11	1.5	>	10
4	>	2.24	12.8	.078		1.5	>	92
5	>	3.3	11.7	.11		3	>	920
6	>	4.5	10.5	.15	7	6	24	4.300
7	>	5.4	9.6	.18		8	>	8.800
8	>	6.3	8.7	.21		15	22	78.000
9	>	7.5	7.5	.25	6.8	19	>	78.000
10	>	8.7	6.3	.29	7.4	> 60 < 120	18	640.000
11	>	9.9	5.1	.33		—	0	
12	>	—	15	—	7.1	1.5	28	1 d.r.m. = 1 × 10

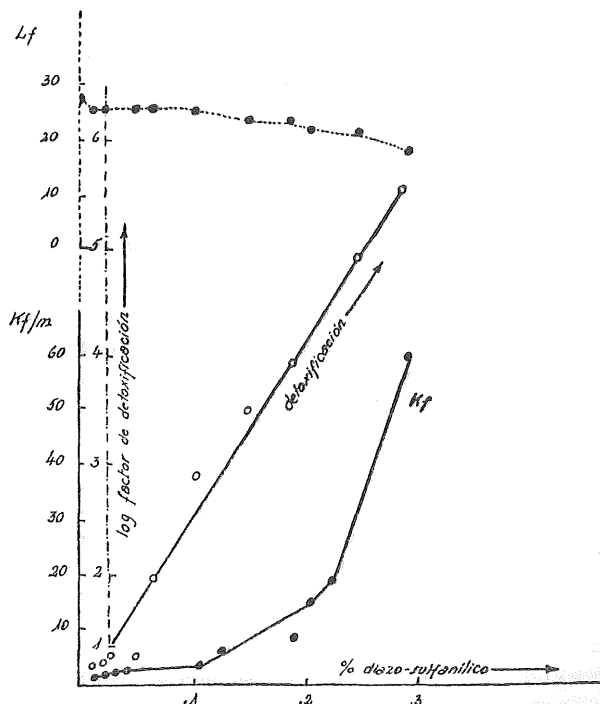


GRÁFICO 1. — Efecto de la concentración del diazo sobre la d.r.m. y Lf, según valores de la tabla I.

2. *Efecto sobre el valor L_+* .—El valor L_+ del compuesto azotoxina ha sido estudiado de la manera siguiente: Se determinó previamente el valor L_+ de la toxina misma. Luego se hicieron una serie de mezclas compuestas cada una por una unidad antitóxica y cantidades variadas de azotoxina. (Estas cantidades oscilaron entre los valores teóricos extremos de $\frac{1}{2}$ a 1 L_+); llevadas las mezclas a un volumen dado, se incubaron durante $\frac{1}{2}$ hora a 22°C , al término de la cual se completaron los sistemas añadiendo a cada mezcla el valor de $\frac{1}{2}$ L_+ de la toxina original, prolongándose la incubación otra media hora. Se inyectó el total de cada mezcla a cobayos de 250 gramos por vía subcutánea. Fueron observados durante cuatro días.

De esta manera se comprobó que la combinación azotoxina-antitoxina estudiada por el método de ERLICH se realiza, para una cierta concentración de diazo compuesto, dentro del orden de valores expresado por el L_f . (Tabla II).

TABLA II

*Efecto de la concentración del diazo (p-diazobencensulfónico)
sobre los valores L_+ y L_f .*

	% diazo	Factor detoxif.	L_f	Kf/m	$L_{+1/2}$ observ.	$L_{+1/2}$ teórico	Observ.
d. r. m. : 1.10^{-6}							
Tox. original	—	1	14	7	.042	.042	ninguna rec.
Azotoxina 124	$>10^6$	0	—	$>.09$.05	»
212	$>10^6$	0	—	$>.09$.0475	»
306	$>10^6$	0	—	$>.09$.0475	»
403	10^5	12	30	.06	.0475	
50275	10^4	12	19	.05	.0475	
60250	10^3	12	14	.05	.0475	
7020	10^3	14	9	.05	.0475	
8015	10^2	14	9	.05	.0475	

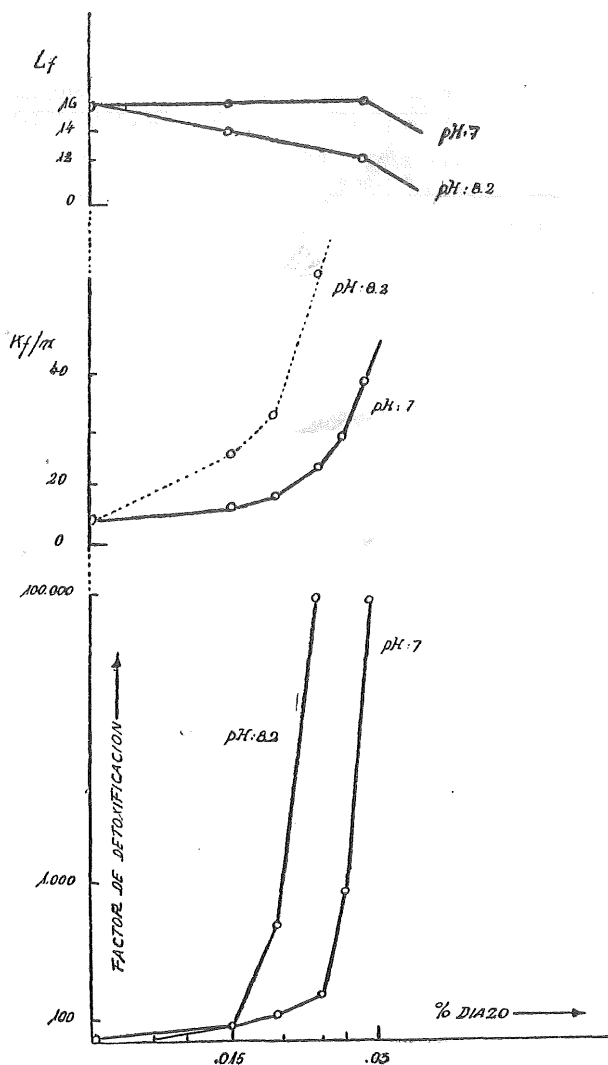


GRÁFICO 2. — Influencia de pH sobre la reacción diazosulfanflico-toxina.

3. *Efecto sobre el valor L_f .*—La concentración del diazo compuesto influye sobre el valor L_f pero en grado mucho menor que sobre la toxicidad. Para factores de detoxificación de 4.300, 78.000 y 640.000 la pérdida en el valor L_f es de 0,7 — 15 y 30 %. En estas condiciones el K_f (tiempo de floculación en minutos) de los diferentes valores L_f aumenta con un factor de 4, 10 y 60. (Tabla I, gráfico 1).

4. *Efecto sobre el valor antigénico.*— Hemos utilizado como antígeno la solución de azotoxina que conservando al máximo los

valores L_+ y L_f hubiese experimentado el más alto grado de detoxificación. Se inmunizaron por vía subcutánea e intravenosa, lotes de 15 cobayos, inoculándose cada animal con dos dosis de 5 L_f a veinte días de intervalo. Al término de cada época se procedió a la sangría exploratriz. Se extrajo de cada cobayo, por punción de corazón y sobre una adecuada cantidad de citrato de sodio, 2 cm³ de sangre. En el plasma que resulta de la mezcla homogénea de la sangría de cada lote, se determinó por el método de ROEMMER con un $Lr/300$ el título en unidades antitóxicas. En estas condiciones, lotes inmunizados con la azotoxina N^o 10, Tabla I, han demostrado contener menos de 1/300 de unidad antitóxica por cm³. El lote control, inmunizado con toxoide diftérico «rutina», contenía 1/10 a 1 unidad antitóxica.

B. — INFLUENCIA DEL pH

La influencia del pH sobre el grado de combinación del diazo compuesto con la toxina ha sido examinado entre 6,8 y 8,2. Dentro de estos límites, a mayor pH, es necesario una menor concentración del diazo para obtener un mismo efecto (Gráfico 2). A constante de diazo, la influencia del pH es tanto menor cuanto más pequeña la concentración del compuesto. Cuando el pH varía de 6,78 a 7,62 con una concentración de 0,175 % de diazo, (Tabla III) el factor de detoxificación varía de 1 a 10 (siendo de 1.000 en el punto inicial) y a pesar de un valor L_f uniforme, su K_f aumenta con un factor de 1 a 2,5. Cuando el factor de detoxificación pasa a 30, el valor L_f cae en un 18 % y el K_f aumenta con un factor de 7.

TABLA III

Influencia del pH a diazo compuesto constante (p-diazobencensulfónico) sobre d.r.m. y L_f .

N ^o	pH	L_f	K_f/m	Factor detoxific.
1	6.78	22	7	1.000
2	7.10	»	6	»
3	7.32	»	6	»
4	7.48	»	12	5.000
5	7.62	»	17	10.000
6	8.17	18	65	30.000
7	8.60	—	—	—
8	8.90	—	—	—
9	7.25	26	1/2	1

Los escasos ensayos realizados con p-nitro diazo bencene y p-sulfamida diazo bencene han demostrado que estos compuestos son menos efectivos en la atenuación de la toxina diftérica. (Tabla IV).

TABLA IV
Acción de p-sulfamidadiazobencene sobre d.r.m. y Lf

Nº	Toxina	Diazo 1 % c.c.	Buffer pH: 7.5 c.c.	% diazo	Lf.	Kf/m	Factor detoxif.
1	10	1.-	1	.1	0	—	0
2	>	.8	1.2	.08	10	360	500
3	>	.5	1.5	.05	12	40	85
4	>	.25	1.75	.025	14	9	10
5	>	—	2	—	14	6	1

RESUMEN

Por agregado de dosis crecientes de un diazo compuesto es posible reducir, hasta un cierto límite, la d.r.m. de una toxina, sin alterar su capacidad de combinación.

En el límite de la detoxificación, se observa un punto crítico, en el cual un nuevo incremento de diazo compuesto anula bruscamente todas las propiedades de la toxina.

La concentración de diazo compuesto que determina una relativa detoxificación sin alterar en mayor grado los valores L_+ y L_f , hace perder prácticamente a la toxina su capacidad de inducir en los animales inoculados la formación de antitoxina.

El elevado porcentaje de proteínas inespecíficas que contiene la toxina utilizada, dificulta el estudio de la acción de la sal de diazonio sobre la toxina misma, dado que dicha sal no sólo se combina con grupos fenólicos (tirosina) e imínicos (histidina) sino que puede dar también reacciones de copulación con otros amino grupos de la molécula proteica.

Por esta razón, uno de nosotros (I.P.) prosigue estas investigaciones con toxina diftérica obtenida en medios simplificados.

Agradecemos a la Dra. PIROSKY, las críticas y la ayuda dispensadas durante la realización de este trabajo.