

## Electrodiálisis del suero antidiftérico de caballo

por el

Dr. RAUL WERNICKE

En numerosos experimentos de electrodiálisis de suero antidiftérico de caballo, realizados con el fin de ver si era posible por este método obtener rápida y económicamente la separación de su parte activa (antitóxica), hemos podido hacer algunas observaciones que consideramos de interés y que expondremos en esta comunicación preliminar.

Ante todo hemos comprobado las grandes ventajas que tiene la electrodiálisis sobre la diálisis común, pues no solamente se acelera enormemente el proceso, sino que también se evita la dilución enorme del suero que en la diálisis común siempre se observa. Hemos procedido en la siguiente forma: Colocamos el suero en una célula cuadrangular con dos paredes de colodio. Sobre cada una de éstas, se adapta un recipiente en que circula agua destilada y en los que sumergen los electrodos inatacables. La capa de suero tiene un espesor no mayor de 15 m m, los electrodos se fijan a varios centímetros de la membrana y se establece entre ellos una diferencia de potencial de 220 V.

En el cuadro siguiente pueden observarse los resultados obtenidos y compararlos con los de la diálisis común. En algunos casos hemos empleado electrodiálisis y diálisis sucesivamente.

*Electrodiálisis de suero de caballo*

Fecha	Durac. en horas	Conductividad esp.		Volumen		Observaciones	
		inicial	final	inicial	final		
12-XII	3.30	116.10	16.7	10—4	80 cc.	80 cc.	
20-XII	3.40	116	9.8	„	85 „	110 „	
29-XII	6.27	116	1.2	„	90 „	90 „	
30-XII	20.40	116	0.11	„	80 „	80 „	Operac. mixta (1)
2-I	5.10	93	0.2	„	85 „	73 „	
12-I	5.20	93	0.17	„	85 „	65 „	
25-I	4.10	93	0.14	„	30 „	23 „	
26-I	27.—	93	0.096	„	30 „	33.5 „	Operac. mixta (2)
31-I	4.35	93	0.12	„	28 „	18.5 „	
8-II	3.45	93	0.20	„	26 „	40 „	
14-II	4.50	93	0.16	„	29 „	22.5 „	
20-II	25.—	93	0.12	„	28 „	28 „	Operac. mixta (3)
8-III	25.30	93	0.16	„	27 „	17 „	Operac. mixta (4)
16-III	31.20	93	0.2	„	29 „	33.5 „	Operac. mixta (5)

- (1) Diálisis durante 6 h. 55' y electrodiálisis durante 14 h. 45'  
 (2) „ „ 23 h. „ „ 4 h.  
 (3) „ „ 13 h. 40' „ „ 12 h. 20'.  
 (4) „ „ 16 h. „ „ 9 h. 30'.  
 (5) „ „ 19 h. „ „ 12 h. 20'.

En una operación de diálisis común realizada en el mismo aparato de la electrodiálisis pero suprimiendo el campo eléctrico, obtuvimos el siguiente resultado:

Duración de la diálisis: 191 horas  
 Conduct. específica inicial: 93 10—<sup>4</sup>  
 » » final: 0.57 »  
 Volumen inicial de suero: 82 cc.  
 » final » » 112 « (hubo pérdida de líquido probablemente!).

En la electrodiálisis del suero de caballo observamos que a los pocos minutos éste toma reacción ácida al tornasol, y la recupera

fácilmente en el caso de que procediéramos a neutralizarlo durante la operación. El suero electrodiálizado tiene reacción ácida.

Por electrodiálisis precipita abundantemente el suero. Ese precipitado blanco, con grumos amarillentos diáfanos, es incompletamente soluble en soluciones de Cl Na, pero perfectamente soluble en presencia de pequeñas cantidades de álcali. En algunos casos hemos obtenido precipitados perfectamente solubles en soluciones salinas, pero aún no hemos establecido de qué depende esta variación de solubilidad.

En algunos casos hemos observado sobre la membrana del lado catódico un depósito membranoso de débil espesor, transparente, que se desprende fácilmente en láminas.

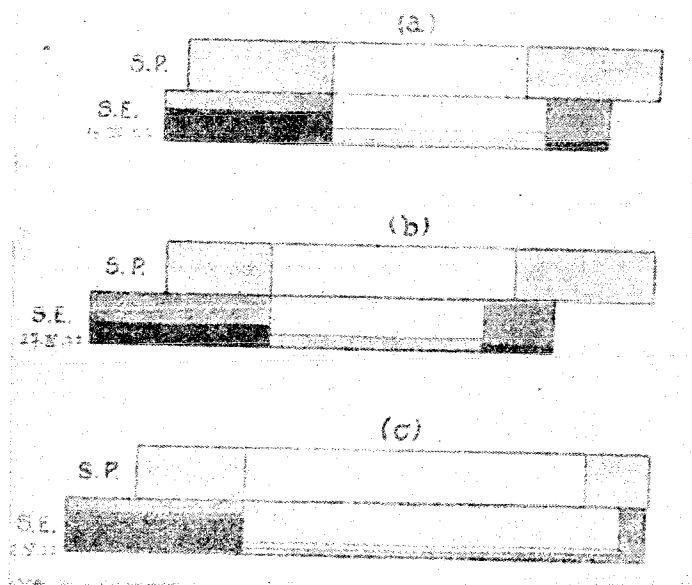
Hemos estudiado en algunos casos la distribución de las albúminas en el precipitado y en el líquido sobrenadante, y hemos comprobado la constitución del suero antes y después de la electrodiálisis.

Los resultados figuran en los cuadros siguientes:

*Fraccionamientos de las proteínas del suero de caballo  
antes y después de la electrodiálisis.*

		Englob.	Pseudogl.	Albúm.	Total
SUERO 605 20-II-22...	Suero sobrenadante..	1.40	2.27	1.54	5.21
	Electr. mixta: 26 h. . . . .	2.82	0.70	—	3.52
a) SUERO 605 16-III-22	Suero sobrenadante..	1.10	2.81	1.16	5.07
	Electrodiálisis mix- ta: 31 h 20' . . . . .	3.20	1.43	0.11	3.74
	Suma total . . . . .	3.30	4.24	1.27	8.81
El mismo suero sin electrodiálisis . . . . .		2.87	3.85	2.65	9.37
b) SUERO 605 27-III-22	Suero sobrenadante..	1.92	3.24	1.22	6.38
	Electrodiálisis mix- ta: 8 h 15' . . . . .	1.62	0.99	0.17	2.78
	Suma total . . . . .	3.54	4.23	1.39	9.16
El mismo suero sin electrodiálisis . . . . .		2.68	4.86	2.78	9.72
c) SUERO 614 2-V-22...	Suero sobrenadante..	0.73	5.46	0.52	6.71
	Electrodiálisis mix- ta: 23 h . . . . .	2.31	1.99	—	4.30
	Suma total . . . . .	3.04	7.45	0.52	11.01
El mismo suero sin electrodiálisis . . . . .		2.00	6.72	1.26	10.08

Los dosajes de las fracciones de proteínas se han realizado por precipitación y lavaje con solución de sulfato amónico al 33 % y 50 % de saturación. Los precipitados redisueltos de euglobulinas y pseudoglobulinas y la albúminas no precipitadas, fueron dosadas por precipitación con reactivo Esbach y medido el volumen del precipitado, centrifugándolo en tubos calibrados. Si bien este método no es muy exacto, da resultados perfectamente comparables, como hemos podido comprobarlo. Por este motivo hacíamos simultáneamente los dosajes del suero primitivo y electrodializado, procediendo siempre en idénticas condiciones.



*Fraccionamiento de las proteínas del suero de caballo antes y después de la electrodiálisis*

S. P., Suero primitivo; S. E., Suero electrodializado. Tonos de la izquierda: Euglobulinas. Centrales: Pseudoglobulinas. De la derecha: Seroalbúmina.

En los cuadros anteriores puede verse:

- 1° El precipitado está constituido por globulinas, y pequeñísimas cantidades, a veces no apreciables, de albúmina.
- 2° El precipitado contiene mayor cantidad de euglobulinas.
- 3° La precipitación de las globulinas no es total, siendo más completa para las euglobulinas.

Todos estos resultados son perfectamente explicables, con las ideas que tenemos, sobre solubilidad de las albúminas del suero.

Pero los mismos cuadros nos revelan un fenómeno que mucho nos ha llamado la atención. El suero electrodializado contiene una mayor proporción de globulinas, y disminución correspondiente de albúminas, manteniéndose naturalmente, igual su cantidad total. Es decir, parece que la electrodiálisis modifica la seroalbúmina, dándole caracteres de globulinas, al menos desde el punto de vista de su precipitación con  $\text{SO}^2$  ( $\text{NH}^4$ )<sup>2</sup>. En el suero electrodializado aumentan simultáneamente las euglobulinas y pseudoglobulinas. Se tratará de una transformación de sero albúminas en seroglobulinas? Recordemos que Moll dice haber transformado albúminas en globulinas, calentándolas a 56° media hora, en solución ligeramente alcalina. Aún no hemos comprobado las observaciones de Moll, pero sabemos que otros investigadores no lo han logrado.

Como el precipitado de la electrodiálisis no es totalmente soluble en solución salina, hicimos la separación de la fracción soluble en sales y soluble en álcali, con los resultados consignados en el siguiente cuadro:

SUERO 614. Electrodiálisis del 2-3/V/1922	Euglobulinas	Pseudoglob.	Albúmina	Total
Suero sobrenadante.....	0.73	5.46	0.52	6.71
Parte soluble en sales del precipitado....	0.21	1.05	—	1.26
Parte insol. en sales, sol. en álcali del ppdo.	2.10	0.94	—	3.04
Total en el precipitado.....	2.31	1.99	—	4.30
Total en el suero electrodializado.....	3.04	7.45	0.52	11.01
Suero no electrodializado.....	2.10	6.72	1.96	10.08

De qué naturaleza son estas modificaciones que produce la electrodiálisis sobre las proteínas del suero? Se producirá realmente, una transformación de albúminas en globulina, o habrá en estas proteínas sólo diferencias de grado en sus propiedades, que la corriente eléctrica nivela, al menos parcialmente?

El oscuro problema de las proteínas constituyentes del suero, nos abre una nueva vía para su estudio y confiamos en que nuestras actuales investigaciones nos permitirán arrojar alguna luz sobre él.

A pesar de las variaciones de solubilidad experimentadas por las proteínas del suero, es interesante hacer notar, que no hemos comprobado disminución apreciable en sus propiedades antitóxicas.

La distribución de las unidades antitóxicas en las distintas fracciones obtenidas por electro-diálisis del suero anti-diftérico, puede verse en el siguiente cuadro:

Suero 605.—Contiene 165 U. A. en 1 c.c.

Electrod.	{	Líquido sobrenadante, contiene 145 U. A. c.c.
20 - I - 22		Solución del ppdo. contiene 14 U. A. c.c.

Suero 614.—Contiene 300 U. A. en 1 c.c.

Electrod.	{	Líquido sobrenadante contiene 63 U. A. c.c.
2 - V - 22		Solución salina ppdo. contiene 10 U. A. c.c.
		Solución alcalina ppdo. contiene 25 U. A. c.c.

Las fracciones del suero electrodiализado 605, fueron llevadas por dilución hasta el volumen primitivo, en cambio para el suero 614 se diluyeron al tercio.

La electrodiálisis no disminuye sensiblemente la actividad antitóxica, pero no se consigue una separación neta de fracciones activas e inactivas. Como era de esperar, la mayor actividad se observa en la fracción que contiene mayor cantidad de pseudoglobulinas.

Es interesante hacer notar que a pesar de las modificaciones importantes que en su solubilidad experimentan las proteínas del suero, no se observa una variación apreciable de su actividad antitóxica.

Esperamos que nuestras actuales investigaciones nos permitan aclarar en algo, desde el punto de vista interpretativo, todos estos fenómenos que hemos observado.

#### CONCLUSIONES

Sometiendo suero antidiftérico de caballo a la electrodiálisis se observa una modificación en la precipitabilidad de las proteínas, aumentando la proporción de las más inestables (englobulinas y pseudo globulinas) a expensas de las más estables (seroalbúmina).

La electrodiálisis no disminuye sensiblemente la actividad antitóxica del suero, y no ha permitido una separación cuantitativa de las proteínas activas de las inactivas.

### CONCLUSIONS

On a observé dans le serum antidiphtherique de cheval purifié par l'électrodialyse une modification des propriétés de ses protéines. Il y a une augmentation des fractions plus facilement précipitables par de sulfate d'ammoniaque (euglobulines et pseudoglobulines) et une diminution corrélatrice des fractions plus stables (seroalbumine).

On n'a pas pu obtenir par l'électrodialyse du sérum une séparation quantitative de ses fractions antitoxiques et inactives.

L'électrodialyse ne diminue pas l'activité antitoxique du sérum.