
MINISTERIO DEL INTERIOR
DIRECCION NACIONAL DE SALUD PUBLICA

REVISTA
DEL
INSTITUTO BACTERIOLOGICO
"DR. CARLOS G. MALBRAN"

Espectros de absorción en la reacción
de Tabanera

Por F. MODERN, J. A. TABANERA y G. RUFF

Uno de nosotros ⁽¹⁾ presentó en el año 1941 y 1942 ⁽²⁾ una nueva sero-reacción de precipitación con ácido sulfúrico que consistía en tratar 0,2 cm³ de suero humano con 3 cm³ de una dilución de ácido sulfúrico *d* : 1,84 (25 cm³ de SO₄H₂ en 275 cm³ de H₂O bi-distilada). Comprobó asimismo que normalmente al cabo de 24 horas de mezclados a temperatura ambiente se producían flóculos que luego precipitaban. En ciertos estados patológicos, este fenómeno no se registraba apareciendo sólo una débil opalescencia. Luego, este mismo autor comunicó sus primeras observaciones clínicas de su reacción; estudió 1022 casos de distintas enfermedades y destacó que en los estados ulcerosos del intestino grueso y delgado había comprobado reacción positiva (no precipitación del suero con el ácido). Además hizo notar que en la tuberculosis intestinal y fiebre tifoidea siempre había obtenido resultados positivos. Posteriormente nosotros ⁽³⁾ hicimos los primeros estudios físico-químicos tendientes a precisar la naturaleza de esta sero-reacción. Pudimos comprobar que la seudoglobulina normal no impide la

Presentado para publicar el 11 de mayo de 1943.

precipitación, mientras que la pseudoglobulina de los sueros con reacción positiva posee gran poder protector. Además se comprobó por medio del fraccionamiento proteico, un aumento en las pseudoglobulinas de los sueros con reacción positiva. Tratamos de explicar la falta de precipitación por el aumento de la fracción pseudoglobulínica o por la presencia de alguna substancia desconocida.

PREPARACIÓN DE LAS FRACCIONES PROTEICAS

Suero positivo: A 100 cm³ de suero se le agregan 200 cm³ de solución fisiológica; esta dilución contiene en 1 cm³ 3,815 miligramos de nitrógeno. A 296 cm³ de esta dilución se le agregan 40 gramos de SO₄Na₂ seco y anhídrido, se disuelve a 40°C, se deja reposar 3 horas y se filtra. 1 cm³ del filtrado contiene 3,01 mg de nitrógeno. El precipitado corresponde a la fracción euglobulínica que se lava con 100 cm³ de SO₄Na₂ al 14%. Luego se dializa en papel de celofán, y se concentra en desecador a la temperatura ambiente; se reduce a un volumen de 21 cm³; 1 cm³ contiene 7,21 mg de nitrógeno. A 280 cm³ del filtrado anterior al cual se le separó ya la euglobulina, se le agrega 23,8 g de SO₄Na₂, se disuelve a 40°C y se deja reposar en la estufa durante la noche. Se filtra, 1 cm³ del filtrado contiene 1,82 mg de nitrógeno. La pseudoglobulina precipita en esta etapa, se lava con 100 cm³ de SO₄Na₂ al 23%. Se dializa en papel celofán y se concentra en desecador sulfúrico a temperatura ambiente a 33 cm³; 1 cm³ contiene 9,17 mg de nitrógeno. Las albúminas que corresponden a la fracción que no precipita con SO₄Na₂ al 22,2% y que en nuestro caso es el último filtrado, se dializó en tubos de celofán hasta que el agua exterior no diera reacción de ión sulfato. Se obtuvo así 50 cm³ de albúmina pura, libre de electrolitos, con un contenido por centímetro cúbico de 6,05 mg de nitrógeno.

La medición inicial de las tres fracciones antes de concentradas dió el siguiente valor:

Euglobulinas	0,895 mg N/cm ³	= 21,10 %	} 52,29 %
Pseudoglobulina	1,190 »	» 31,19 »	
Albúmina	1,82 »	» 47,71 »	

Suero normal: A 95 cm³ de suero se le agregan 190 cm³ de solución fisiológica, esta dilución contiene en 1 cm³: 4,34 mg de nitrógeno. A 281 cm³ de esta solución, se le agregan 38 g de SO₄Na₂, se disuelve a 40°C, se deja reposar a esta temperatura 3 h y se filtra. El filtrado contiene en 1 cm³: 3,675 mg de N. Esta dife-

rencia corresponde a la fracción euglobulínica precipitada. Las euglobulinas que precipitaron en esta etapa se lavan con 100 cm³ de SO₄Na₂ al 14 %, se dializan en papel de celofán, hasta eliminación total de SO₄Na₂ y se concentra a 23 cm³ en desecador a temperatura ambiente. 1 cm³ contiene 3,78 mg de nitrógeno. A 265 cm³ del filtrado anterior se le agregan 22,52 g de SO₄Na₂, se disuelve a 40°C, se lo deja reposar durante la noche y se filtra. El filtrado contiene por cm³: 2,94 mg de nitrógeno. El precipitado de las seudoglobulinas se lava con 100 cm³ de SO₄Na₂ al 23 %, se dializa en papel celofán hasta tanto comienza la precipitación. Se concentra en desecador sulfúrico hasta 28 cm³ (temperatura ambiente), 1 cm³ de esta solución de seudoglobulinas contiene 4,20 mg de nitrógeno. El último filtrado que corresponde a la fracción albumínica se dializa en papel de celofán y se concentra en desecador sulfúrica al vacío hasta 60 cm³; 1 cm³ de esta solución albumínica contiene 9,24 mg de N. La medición de las tres fracciones antes de concentradas nos dió una proporción de N en el suero normal que figura en el cuadro a continuación:

Euglobulina	0,665 mg N/cm ³ = 15,32 %
Seudoglobulina	0,735 » » = 16,93 »
Albúmina	2,94 » » = 67,74 »

De todas las fracciones se hizo una dilución de manera que su contenido nitrogenado fuera de 6 mg de N %.

En nuestros ensayos espectrométricos utilizamos 2 sueros positivos y 2 sueros negativos. Determinado el N por kjeldahl (ensayo por triplicado) se diluyó en solución de NaCl al 7 ‰ de manera que 100 cm³ de todos los sueros contuvieron 6 mg de N. En todas las diluciones, tanto del suero como de sus fracciones se comprobó después de diluirlo el valor en N obtenido y que correspondía exactamente a 6 mg de N por 100 cm³.

ESPECTROS DE ABSORCIÓN

Campbell Smith (¹) estudiando la seroalbúmina y seroglobulina humana encuentra diferencias en los coeficientes de extinción que le permite diferenciarlas. Nosotros en este trabajo, dejando por el momento de lado el signo de la serorreacción, también encontramos diferencias entre la seroalbúmina, euglobulina y seudoglobulina como pueden observarse y medirse en las curvas que figuran a continuación:

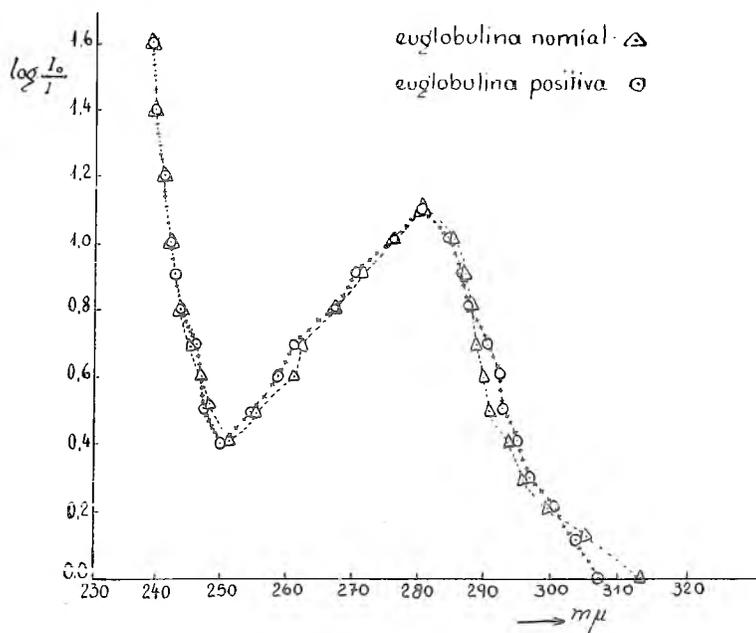


FIG. 1.

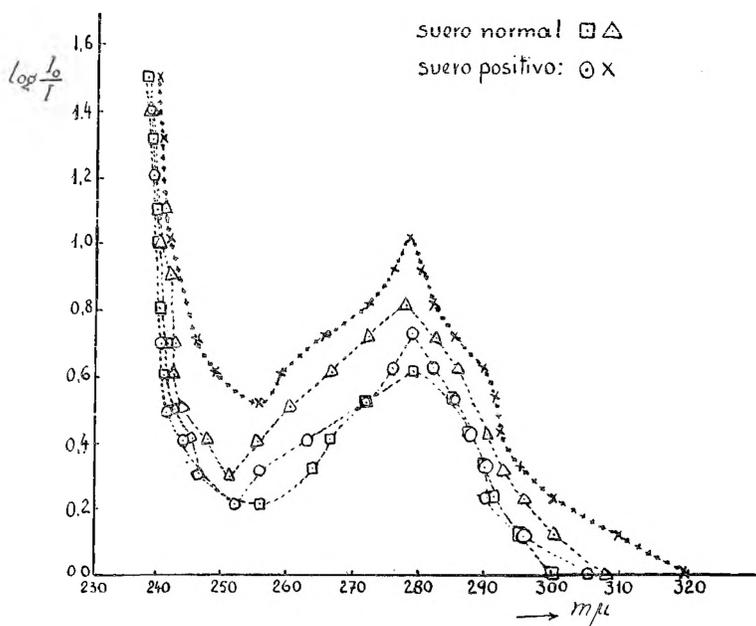


FIG. 2.

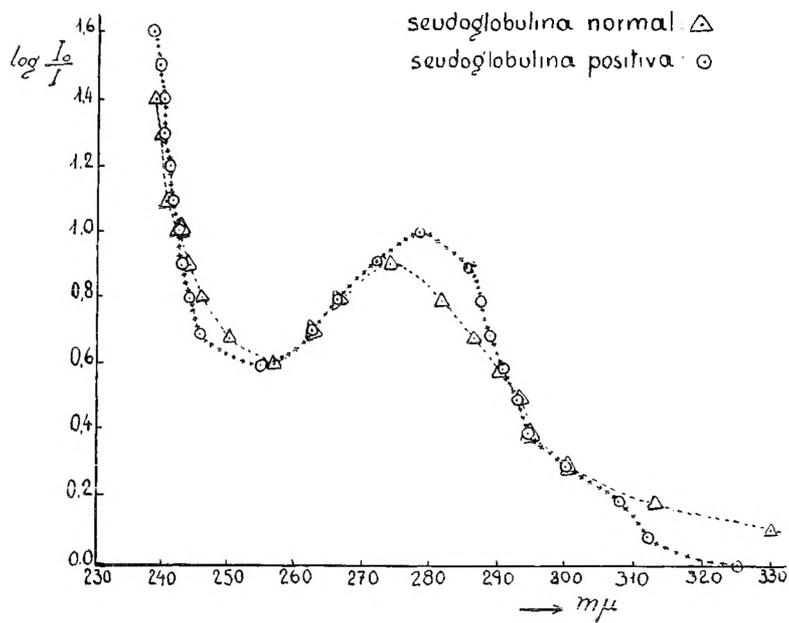


FIG. 3.

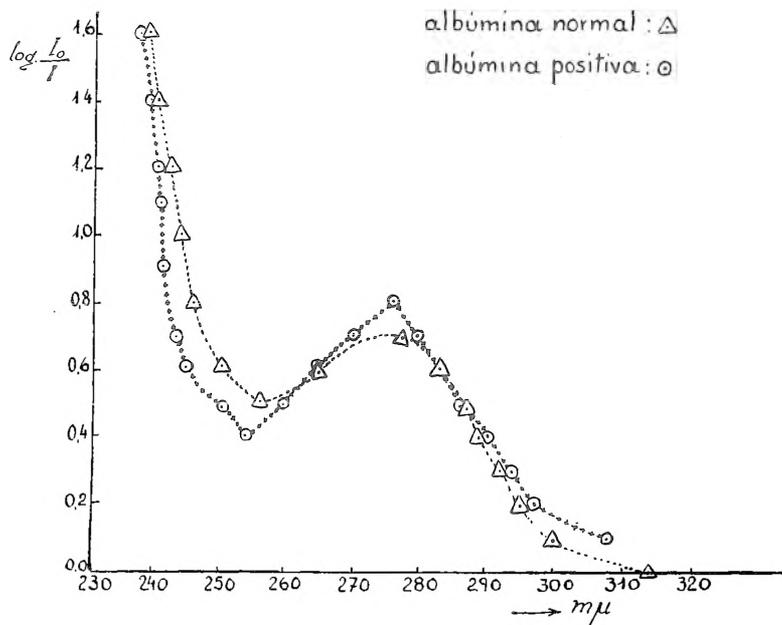


FIG. 4.

El mismo autor en otros trabajos publicados establece las diferencias entre pseudoglobulinas de distintas especies animales. Además en colaboración con Marrack (5) investiga por este procedimiento la toxina diftérica y el precipitado de toxina antitoxina. Estas medidas espectrométricas han tenido gran aplicación en el estudio de las proteínas y fracciones proteicas, y entre nosotros Firosky (6) y Grinstein (7) han llegado a determinar algunas constantes que figuran en los trabajos citados.

Los sueros y sustancias estudiadas dan un espectro de absorción selectivo en el ultravioleta.

Tanto en los sueros como en sus fracciones proteicas se comprueba que existe una banda de absorción en el ultravioleta con un máximo que corresponde a 280 m μ . Se trabajó con las mismas concentraciones nitrogenadas (0,0066 %) y con cubas de 10 mm de diámetro, con exposición de 20 segundos. Utilizamos el espectroscopio de Adam Hilger con óptica de cuarzo. Agradecemos al Dr. Raúl Wernicke, Director del Instituto de Química, el habernos permitido emplear dicho aparato. Además agradecemos al Dr. Mauricio Bühler la valiosa colaboración prestada, en la obtención de las espectrografías y en su lectura.

A continuación damos las características espectrográficas de sueros normales y positivos y de sus fracciones proteicas.

CUADRO N° 1

	Sueros normales		Sueros positivos		Eu. norm.	Eu. positiva	Seudo N.	Seudo P.	Alb. N.	Alb. P.
$\text{Log } \frac{I_0}{I}$ máx	0,7	0,6	1,0	0,8	1,1	1,1	0,9	1,0	0,7	0,8
$\text{Log } \frac{I_0}{I}$ mín	0,2	0,2	0,5	0,3	0,4	0,4	0,6	0,6	0,5	0,4
λ max m μ	279	279	277	277	280	280	275	280	275	275
λ mín m μ	250	255	255	250	250	250	255	255	255	253

De acuerdo con el trabajo de Stenström y Reinhard (8) la banda de absorción a 2800 Å (280 m μ) es debida a las proteínas y a la presencia de tirosina y triptofano. Esto nos indicaría de acuerdo con esta observación que en todas las mediciones realizadas en las fracciones proteicas y suero completo se encuentran estos aminoácidos no diferenciándose mayormente los sueros normales de los positivos.

Las diferencias que existen en los máximos y mínimos las damos a continuación en el cuadro que sigue y se observa:

CUADRO N° 2
Concentración de nitrógeno 0,006 %

Proteínas	Log. $\frac{I_0}{I}$ máx.	Log. $\frac{I_0}{I}$ mín.	$\Delta \log. \frac{I_0}{I}$	χ	
				máx.	mín.
Suero normal 1	0,7	0,2	0,5	279	250
» » 2	0,6	0,2	0,4	279	255
» positivo 1	1,0	0,5	0,5	277	255
» » 2	0,8	0,3	0,5	277	250
Euglobulina nor.	1,1	0,4	0,7	280	250
» pos.	1,1	0,4	0,7	280	250
Seudoglobulina nor.	0,9	0,6	0,3	275	255
» pos.	1,0	0,6	0,4	280	255
Albúmina normal	0,7	0,5	0,2	275	255
» positiva	0,8	0,4	0,4	275	253

Notamos que la albúmina, de los sueros positivos da una diferencia mayor entre el máximo y el mínimo, pues $\Delta \log \frac{I_0}{I} = 0,4$ en cambio la albúmina normal nos da un valor de 0,2.

La euglobulina normal y la positiva no da diferencias del punto de vista espectrométrico pues corresponde $\Delta \log \frac{I_0}{I} = 0,7$ en los dos casos.

La seudoglobulina positiva da también una diferencia mayor, que creemos no es atribuible a errores del método, pero convendría repetir en otros sueros positivos y normales estas experiencias para sacar conclusiones definitivas.

El hecho que la fracción albumínica de $\Delta \log \frac{I_0}{I} = 0,2$ en los sueros normales está de acuerdo con el trabajo de T. Svedberg y B. Sfögren⁽⁹⁾ quienes encuentran el mismo valor, siendo esta cifra superior en los sueros positivos (Reacción Tabanera).

CONCLUSIONES

Se estudian los espectros de absorción de los sueros (positivos reacción Tabanera y normales) y sus fracciones proteicas.

Tanto los sueros (positivos y negativos) como sus fracciones proteicas dan espectros selectivos en el ultravioleta (entre 230 m μ y 320 m μ).

En el cuadro I y II de este trabajo figuran las diferencias encontradas.

La fracción albumínica correspondiente al suero positivo da $\Delta \log \frac{I_0}{I} = 0,4$ y la misma fracción del normal 0.2.

La pseudoglobulina de un suero positivo da $\Delta \log \frac{I_0}{I} = 0.4$ y la misma da un suero normal 0.3.

Las englobulinas no dan diferencias y los sueros íntegros tampoco.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) TABANERA, J. A. — *An. Cated. de pat. y clín. tuberc.* 3: 22-26 (1941).
- (2) TABANERA, J. A.; MODERN, F., y RUFF, G. — *An. Cated. de pat. y clín. tuberc.* 3: 238-253 (1941).
- (3) TABANERA, J. A. — *An. Cated. de pat. y clín. tuberc.* (1942).
- (4) CAMPBELL SMITH. — *Proc. Roy. Soc. B.* Vol. 104 (1929).
- (5) CAMPBELL, SMITH; MARRACK. — *Proc. Roy. Soc. B.* Vol. 106 (1930).
- (6) PIROSKY, I. — Tesis Fac. Ciencias Médicas Bs. As. (1931).
- (7) GRINSTEIN, M. — *Rev. Inst. Bact.* Vol. 7, N° 3 (1936).
- (8) STENSTROM y REINHARD. — *J. Biol. Chem.*, tomo 66, pág. 819 (1925).
- (9) SVEDBERG, T. — *Sfogren J. Am. Chem. Soc.*, 50, 3318 (1928).