

Tesis de Posgrado

Nucleoproteína del B. Anthracis

Ferramola, Raúl

1934

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ferramola, Raúl. (1934). Nucleoproteína del B. Anthracis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0182_Ferramola.pdf

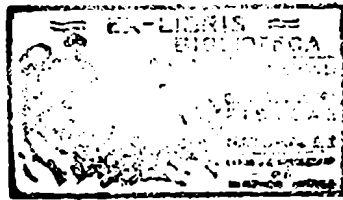
Cita tipo Chicago:

Ferramola, Raúl. "Nucleoproteína del B. Anthracis". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1934.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0182_Ferramola.pdf

Hesis

NUCLEOPROTEINA DEL E. ANTHRACIS



Hesis: 182

Raúl Ferramola

1930-1931

A partir del año 1930, Soratti, Paulofeu y Perrieri, han ocupado de la actividad antigénica del B. Anthracis y la de sus fracciones extraíbles con solución de cloruro de sodio.-

Los resultados obtenidos, se hallan resumidos en un informe de comunicaciones (1), de donde transcribimos a continuación algunas conclusiones que tienen estrecha relación con este trabajo. Elos se refieren en particular a la técnica utilizada para la obtención de las fracciones frías del B. anthracis y a los resultados obtenidos con los sueros de los caballos inmunizados con las mismas. Hasta comprender en primer término las siguientes investigaciones:

- 1) Obtención a partir de B. anthracis, de cuatro antígenos de naturaleza distinta.-
- 2) Investigación en el suero de caballos inmunizados con estos antígenos, de anticuerpos de fijación.-
- 3) Investigación en los mismos sueros, de anticuerpos de coagulación.-

1) Obtención de los antígenos (2).- El método utilizado para la obtención de los antígenos lo transcribimos del trabajo original de Soratti y Paulofeu. Como medio de cultivo puede usarse el medio de agar-suero o caldo.-

"Los B. anthracis provenientes del cultivo, se suspenden en solución fisiológica (1 c.c. en unos 300.000 millones por c.c.) y se lavan dos veces con dicha solución.- El residuo (designado fracción 1) está constituido por bacilos lavados. El líquido sobrenadante se centrifuga en solución fisiológica (o suero fracc. n.º 3), y se lavan cuatro veces las fracciones del B. anthracis. De la fracción 2, se obtienen los anticuerpos de fijación, y de la fracción 3, los anticuerpos de coagulación.-

ción con ácido

3.8-4

100-

del este tipo. La primera de éstas (designada fracción A) es constituida por sustancias de naturaleza proteica, impurificadas por sustancias absorbidas, y la segunda (designada fracción D) contiene una sustancia con características de un hidrato de carbono simple. La purificación de la fracción C se hace por insolubilización por precipitación con ácido sulfúrico a pH 3.8-4; la de la fracción B por el anclaje de las sustancias precipitables a pH 3.8-4."

Por consiguiente, de acuerdo a este método de preparación los antígenos obtenidos serán los siguientes:

- A) Antígenos lavados.
- B) Líquido sobrenadante de los B. antígenos.
- C) Núcleo proteico de B. antígenos.
- D) Sustancia muy difícil soluble del B. antígeno, de naturaleza hidrocárbónica.

Como se verá más adelante, la fracción (C) de naturaleza hidrocárbónica es la más activa en este trabajo.

Investigación de anticuerpos de fijación (3). - Los métodos preparatorios de este método antes descrito, fueron muy efectivos para la formación de anticuerpos, con el objeto de inmunizarlos y provocar en ellos la formación de anticuerpos. La investigación de estos fue efectuada después de tres meses y medio de inmunización, según la técnica empleada por Sordelli y sus colaboradores (4). - Para efectuar la inmunización se utilizó el suero soluble en agua destilada saturado de anhídrido carbónico y como antígenos emulsiones de B. antígeno cultivadas en agar-suero o caldo.

Investigación de la actividad de la enzima

Número	Concentración	Actividad de la enzima	Actividad de la enzima
		por hora	por hora
1	0.001	0.001	0.001
2	0.002	0.002	0.002
3	0.01	0.005	0.005
4	>0.01	>0.02	>0.02

Los resultados de la investigación de la actividad de la enzima, se muestran en el cuadro siguiente.

3) Investigación de la actividad de la enzima en la coagulación de la fibrina. - En esta investigación se utilizó el método de la coagulación de la fibrina. La investigación se realizó por el método anterior, es decir, se investigó la actividad de la enzima en los cuatro frascos de la siguiente manera: se colocaron en los frascos 1 y 2, 0.001 y 0.002 de la enzima respectivamente, y en los frascos 3 y 4, 0.01 y >0.01 de la enzima respectivamente. Los resultados de la investigación se muestran en el cuadro siguiente.

En la investigación de la actividad de la enzima en la coagulación de la fibrina, se utilizó el método de la coagulación de la fibrina.

Los resultados de la investigación, se muestran en los cuadros siguientes.

CUADRO 1. ANTICUARIAS DE CALIBRACION.

Dilución del extracto de B. anthracis	Sueros preparados con:				
	B. anthracis de agar	B. anthracis de caldo	B. anthracis lavados	Líquido sobren.H	Hidrato de carbono
1/1	++++	+++	++++	++	++
1/3	++++	++	++	++	++
1/10	+++	+	++	+	+

CUADRO 2. AGUININAS.

Suero preparado con:	1/100	1/300	1/1000	1/3000	1/10000
B. anthracis: agar (938)	++++	++++	++++	++++	++
B. anthracis: caldo (894)	++++	++	+	○	○
B. anthracis: lavados A.	++++	++++	++++	++++	+
Líquido sobren. ante B (2000)	++++	++++	++++	++	+
Nucleoproteína C (3007)	+++	++++	++++	++	+
Hidrato de carbono D (3010)	○	○	○	○	○

De acuerdo con los resultados obtenidos con estos, la actividad precipitante de sueros preparados con el líquido sobrenadante (A) o no, es muy superior a la de los obtenidos con el líquido sobrenadante (B) o con la fracción (C). En cambio y en esta concuerda con los resultados anteriores, el antígeno hidrocarbonado (D), carece de actividad precipitógena y aglutinógena.-

Posteriormente (6), se ha continuado con el estudio B. anthracis habiéndose separado las fracciones siguientes diversos tratamientos y ensayándolos frente a sueros de caballos inmunizados con B. anthracis enteros. Ello ha permitido conocer más íntimamente las características de estos antígenos, especialmente en lo que se refiere a la determinación de la fracción que actúa como antígeno en la reacción en vitro.-

La química del B. anthracis, siendo sin embargo, poco estudiada. Por tal causa, hemos emprendido el estudio de los antígenos antes mencionados, dando el punto de vista de su composición química, he hecho iniciado las experiencias con la fracción que los investigadores antes mencionados denominaron Fracción C. Como se sabe, de acuerdo a su comportamiento físico-químico y por algunas reacciones químicas, ellos le atribuyeron la constitución de un nucleoproteína. Esta constitución fue luego confirmado con nuestras experiencias.-

La pequeña cantidad de nucleoproteína que suministra a los cultivos de B. anthracis, ha limitado en gran parte la extensión de las experiencias, que se reducen al estudio de la fracción que he denominado nucleoproteína, y a la proteína ácida.-

Estos datos indican que la estructura de nucleótidos...
El estudio de la estructura biológica, de las in-
vestigaciones de la estructura de los nucleótidos y
de los ácidos nucleicos, se han estudiado...
de los ácidos nucleicos, se han estudiado...
de los ácidos nucleicos, se han estudiado...

Entre las breves reseñas de la estructura y trat-
amiento de los ácidos nucleicos, se han estudiado...

Bacteria coli.- Schaffer, Felsen, Casper y La...
obtuvieron... un producto de microscopía, de los...
también... representada... las características
de un ácido nucleico, pero no se estudió posteriormente.-

Protobacter.- En el año 1908 Stahl et (8) identificó un
protobacter... aisló... los ácidos
ribonucleico y adenina, y una... la hipoxantina. Fue el primer
de, en 194, este nucleótido fue estudiado por E.A. Lockridge (9).-
Este investigador... con los ácidos nucleicos a
varios tratamientos (esterilización, extracción con alcohol, etc.) re-
ciendo... ácidos, guanine... La
estructura... la reacción... y Jour-
don y el hidrato... por su comportamiento...
ve... las características... las bases.-

Estudio químico. A.J. R. Venick (10) aisló en 1918...
de los... los ácidos nucleicos...
de los... g/lg...
de los... Al...
de los... de los...

En t. también se par t. -

Las ... errág ... producidos en los intestinos por acción del B.tífico fueron atribuidas por N.Cortestini (11) a las nucleoproteínas de este bacilo. Según dicho autor después de la inyección del B.tífico en el organismo y su localización en los órganos ... tíficos, las nucleoproteínas se liberan por bacteriolisis, actuando entonces por su acción específica sobre los intestinos.-

B.Polettini (12) trabajó también con nucleoproteína del B.tífico y paratíficos A y B, logrando producir secciones anafilácticas, al inyectarlas por vía subcutánea o intravenosa, en conejos.-

Vibrión colérico. Por precipitación con ácido péptico de una solución alcalina de V.chólera, obtuvo I.Blell (13) en 1906 una sustancia con todos los caracteres de una nucleoproteína. Inyectada en conejos se estableció sin reacción, originando anticuerpos (aglutininas). El suero de estos conejos, reaccionaba los cobayos contra dosis 10 veces superiores de vibrión colérico. Las mismas experiencias, fueron realizadas más tarde por A.Lastig y G.Galeotti (14), V. Ferris y A.Nattile (15) y por G.Galeotti (16), obteniendo idénticos resultados. Este último investigador, obtuvo una nucleoproteína por el método de precipitación alcalina, con ácido péptico y sulfato de amonio y esturcolina. Después de haber filtrado esta por el filtro con sus ácidos, resolvió la nucleoproteína en solución de carbonato de sodio al 5%, efectuando las experiencias con esta solución.-

G.S. violi (17), estudió también la nucleoproteína del vibrión colérico, obteniéndola mediante el método de Galeotti. Dicho autor asegura haber obtenido glucosa y sales minerales nucleoproteínicas, sin haber producido anticuerpos. Las reacciones anafilácticas de la nucleoproteína, estudiadas por Galeotti (18) obtiene (19) ...

Se anticipa es cuando se inyecta por vía subcutánea o intravenosa a los conejos. En conejos, no consiguió obtener resultados positivos.-

Historia de la tuberculosis. La nucleoproteína obtenida de esta bacteria ha sido una de las mejor estudiadas. El ácido que la forma, fué descubierto en 1898 por Ruppel (19) quien lo denominó ácido tuberculínico e identificó timina entre los productos de su hidrólisis. Posteriormente en 1901, Levene preparó este ácido nucleico pero sin lograr obtener un material de composición constante; sin embargo indicó la presencia de timina y uracilo entre los productos de hidrólisis. Más tarde, en 1921, Long (20) aisló dos bases purínicas guanina y Schaffer, Folkoff y Jones (21) en 1922 constataron la presencia de guanina y la ausencia de pentosas.-

En el mismo año, por indicación de la American National Tuberculosis Association, Johnson y Brown estudiaron la forma del ácido nucleico. Partiendo de 2 Kgs aproximadamente de bacilos secos, obtuvieron 15 gramos de ácido tuberculínico, cantidad de la que pudo aislar 0.1035 gramos de citosina y 0.076 gramos de timina. No constató la presencia de uracilo. Al año siguiente (22), los mismos investigadores estudiaron el nitrato de carbono que formaba parte del ácido tuberculínico. Por hidrólisis encontraron ácidos levulónico y fórmico, razón por la cual descartaron la presencia de pentosas.-

Poco después en 1924, Johnson y Coghill (23) identificaron entre los productos de hidrólisis, 1-antilexitosina. Esta base pirimidica aislaron el nitrato de carbono, y en estudiaron solo por propiedades cristalográficas, es la primera vez que se la encuentra entre los constituyentes de los ácidos nucleicos. Se comprobó en forma definitiva su presencia, será necesario crear una clasificación particular para las nucleoproteínas provenientes de las bacterias.-

de cura (1), los 1913 y 1914 se hizo un
 trabajo en el laboratorio de la Biología tuberculosa. Obtuvo un extracto
 soluble en los ácidos, soluble en el agua y soluble en el alcohol. Este
 extracto, por los métodos de hidrólisis encontró idéntico a los
 de los otros ácidos. No ha sido posible constatar la
 presencia de ácidos.

Streptococcus haemolyticus. El estudio de las nucleopro-
 teínas de estas bacterias es el de K. Anello, Kuehner y
 Nisenzon (2) obtuvieron del Streptococcus scarlatinae, mediante
 todos los métodos, nucleoproteínas que reaccionan en la piel humana,
 los efectos de comparar su efecto con la reacción producida por la
 Dick.-

Hilberberg y Kendall (36), del mismo Streptococcus obte-
 vieron un producto fácilmente hidrolizable, que difiere química y bioló-
 gicamente de las nucleoproteínas obtenidas mediante el método clásico.-

Otras bacterias.- Falta mencionar aún, algunas más o me-
 nos provenientes de otras bacterias.-

Del bacilo diftérico, extrajo Anson (27) mediante trata-
 miento con hidróxido de sodio y precipitación con ácido acético, un
 producto que contiene fósforo, proteínas, bases nitrogenadas y un azúcar.-

Galotti (28) en 1898 de un microrganismo que él llamó
 el Bacillus reni icus (Ernst), obtuvo un nucleoproteína que estudió
 el punto de vista biológico.-

W. Toennissen (29) separó del pneumo bacilo de Fréchal por
 tratamiento con agua, acetato de sodio y ácido acético, un
 extracto que al ser purificado convenientemente, daba un extracto
 número 9.33, reaccionaba positivamente al biuret y mediante el
 método de la nitro base de G. S.-

.Carapelle (30) estudió las nucleoproteínas del *B. prodigiosus*. El producto, previamente purificado por el método de Hamnersten, fue hidrolizado para investigar la presencia de hidratos de carbono. Identificó este por sus propiedades ópticas, poder reductor y formación de osazonas.-

S. Canata (31), extrajo nucleoproteínas del *Meningococcus* de Weischaelbaum cultivados en agar ascítico y aclimatados luego en agar común. Utilizó la técnica descrita por Lustig y Galeotti y el producto obtenido lo inyectó en conejos con intervalos de tres a cuatro días. Investigó luego la presencia de anticuerpos, obteniendo resultados positivos.-

Ultimamente R. Coghill (32) aisló del *Mycobacterium phlei* (Mooler) una nucleoproteína que por hidrólisis libera guanina, uracilo y citosina; no se pudo encontrar timina. El hidrato de carbono, una pentosa, se halla presente en una concentración superior al 20 %.-

Estos antecedentes, ponen de manifiesto la presencia constante de nucleoproteínas en las bacterias, nucleoproteínas que pueden extraerse mediante un método general, que consiste en tratar las bacterias con soluciones debilmente alcalinas (carbonato o hidróxido de sodio) y precipitar luego la nucleoproteína con ácido acético. Las sustancias obtenidas en esta forma, dan lugar a la formación de anticuerpos, cuando se inyectan en animales por vía subcutánea o intravenosa, tal como se ha visto en el caso del *B. anthracis*.-

Por el contrario cuando por tratamiento adecuado se ha separado del caldo cultivo, la fracción proteica, se obtienen productos de composición semejante (salvo algunas excepciones) cuyo poder antigénico no puede ser determinado. La bibliografía es probable dado la estructura relativamente simple de los ácidos nucleicos, que dicha propiedad sea

Introducción

Historia

10

Introducción

PART EXPERIMENTAL

Obtención de las nucleoproteínas del B. anthracis.-

Los B. anthracis necesarios para la obtención de la nucleoproteína, se obtuvieron por siembras en caldo. A fin de lograr una cantidad de material suficiente para efectuar las experiencias, fué necesario sembrar 50 litros de cultivo. Transcurrido el tiempo necesario para obtener un crecimiento adecuado de bacterias, se separaron éstas por centrifugación y una vez secas, se pulverizó a fin de destruir su integridad y poder someterlas luego a la acción de los solventes. El producto pulverizado, se emulsionó con solución fisiológica, lavándose luego dos veces con dicha solución, y se trataron con ácido sulfúrico diluido, hasta llevarlos a pH 3,8-4. El reactivo abundante que se obtuvo se filtró, se lavó con alcohol y se seccó al vacío. Operando en estas formas, se logró reunir 0.970 gr. de un producto blanco grisáceo, que se utilizó en los ensayos de identificación en continuación.-

Reacciones de identificación

En páginas anteriores, se indicó que los autores que estudiaron las propiedades inactivantes de esta fracción del B. anthracis, supusieron que se trataba de una nucleoproteína. Algunas reacciones cualitativas efectuadas con una porción (0.1 g) confirmaron este parecer. El producto disuelto en solución fisiológica y neutralizado hasta pH 7, reacciona positivamente al Biuret, Millon, Molisch y revela la presencia de fósforo. Los álcalis de Muehlver, totalmente los ácidos de precipitar al llevar a la solución a 2.8-4. Esta

comportamiento propio de las nucleoproteínas, puede sin embargo ser originado también por proteínas simples, que por impurezas adsorbidas, diere reacciones positivas de fósforo y de hidratos de carbono. Esta posibilidad decidió tratar de purificarlas.-

Ensayos de purificación

Los ensayos de purificación efectuados, fueron los siguientes:

- 1º Precipitación fraccionada por variación de pH.-
- 2º Precipitación fraccionada mediante electrolitos.-
- 3º Precipitación fraccionada por variación de pH y electrolitos.-
- 4º Separación por diálisis.-

1º) Precipitación fraccionada por variación de pH.

Porción (0.1 g) del producto finalmente pulverizado, se trató con unas gotas de solución diluida de hidróxido de sodio, en un mortero de ágata, hasta lograr su disolución total. Se diluyó con agua destilada hasta 10 cm³ obteniéndose una solución prácticamente límpida, cuyo pH resultante fué de 8.2 (colorimétrico). Mediante el agregado de ácido acético diluido se disminuyó este paulatinamente mientras se observó la formación de precipitado. Hasta pH 5 no se observó cambio alguno; a 4, la solución se puso débilmente opalescente, a 4.2 aumentó ésta opalescencia y a pH 4 se obtuvo un abundante precipitado. Se separó este por centrifugación y el líquido resultante se trató con mayor cantidad de ácido. No hubo formación de precipitado. El producto separado a pH 4, se secó al vacío y con él se efectuaron las reacciones de Biuret, Folinica y Millon con resultado positivo. La investigación de fósforo efectuada sobre una porción tratada con mezcla sulfonítrica, también dió resultado positivo, si bien con menor intensidad que en el producto

original.-

2^a) Precipitación fraccionada con electrolitos.- Los electrolitos utilizados fueron el cloruro de sodio, sulfato de sodio, y sulfato de amonio.-

Cloruro de sodio. Se preparó una solución de nucleoproteína en hidróxido de sodio, neutralizándola luego con ácido clorhídrico diluido hasta llevarla a pH 7. Gradualmente se adicionaron pequeñas porciones de cloruro de sodio sólido, observando la formación de precipitado y la constancia de pH de la solución. La solución se llegó a saturar con cloruro de sodio, sin lograr separación alguna de precipitado.-

Sulfato de sodio. Este electrolito se comportó en forma análoga al cloruro de sodio. A pH 7, el agregado de sulfato de sodio, no modifica la solubilidad de la nucleoproteína, que no se separa ni aún a saturación.-

Sulfato de amonio. El agregado de sulfato de amonio a la solución de nucleoproteína, disminuye apreciablemente su pH. Esto hace necesario agregar álcali a medida que aumenta la concentración en sulfato de amonio de la solución, a fin de mantener constante el pH final. A pH 7, se obtiene una débil precipitación, cuando se alcanza la media saturación de sulfato de amonio; la opalescencia producida, no aumenta sensiblemente a medida que se satura la solución. Por centrifugación, se separa una pequeña porción que no es suficiente para efectuar reacciones de identificación.-

3^a) Precipitación fraccionada por influencia de electrolitos y variación de pH.

Cloruro de sodio. Una solución alcalina de la misma concentración que la usada en ensayos anteriores, se saturó con cloruro de sodio y se acidificó paulatinamente con ácido acético. Cuando el pH

de esta solución llega a 4.5 comienza una débil opalescencia que se acentúa a medida que aumenta la acidez; a pH 3.8 se obtiene un precipitado abundante. El líquido resultante no precipita por agregado de mayor cantidad de ácido acético. El precipitado no difiere de la sustancia original cuando se la ensaya frente a los reactivos antes indicados.-

Sulfato de sodio. Se ensayó en igual forma que anteriormente. Los resultados fueron iguales que con cloruro de sodio. El producto se separa cuando el pH de la solución se lleva a 3.8-4.-

Sulfato de amonio. La solución de la sustancia se preparó como en casos anteriores; se neutralizó el exceso de álcali y se fué agregando paulatinamente sulfato de amonio. A medida que aumenta la concentración, disminuye simultáneamente el pH de la solución, que a su vez comienza a enturbiarse. Cuando la cantidad de sulfato de amonio agregado, llega al 25 %, y el pH es de 5.4, se nota un enturbiamiento bastante apreciable; por centrifugación se logra separar un pequeño residuo. El agregado de más cantidad de sulfato de amonio no permite obtener mayor cantidad de precipitado, lo que solo se logra cuando el pH llega a 4. Sin embargo la densidad elevada del líquido resultante, dificulta la separación mediante la centrifuga.-

Con el objeto de constatar si el producto que precipita por agregado de sulfato de amonio a 25 %, difiere del primitivo y de que la cantidad que se obtiene es insuficiente para efectuar reacciones de identificación, se la sometió a una prueba biológica. Para ello se preparó una solución al 1 % y se dividió en dos partes. Una de ellas se llevó a pH 4 con ácido acético, se centrifugó y se secó a presión reducida. A otra, se trató con sulfato de amonio en cantidad suficiente para obtener una concentración final del 25 %; el pH era de 5.4. Se centrifugó el precipitado obtenido y se secó como la porción anterior. El

líquido resultante se trató con ácido hasta pH 4, se centrifugó, secó, etc.-

Estas tres fracciones que designamos I, II, y III respectivamente se disolvieron en la forma usual, diluyendo luego hasta obtener soluciones de la misma concentración (1%). Estas fueron usadas como antígenos de precipitación frente al suero de un caballo inmunizado con la fracción nucleoproteica de B.anthraxis. Se utilizaron cantidades decrecientes (desde 0.5 hasta 0.02 mg de producto seco) de antígeno, que se diluyeron hasta 1 cm³ con solución fisiológica.-

Los resultados obtenidos, se consignan en el cuadro sigue, donde se ha designado con cruces la intensidad de la precipitación.-

Suero N^o 3442.

Concentración de antígeno mg/cm ³	Fracción I	Fracción II	Fracción III
0.5	+++	+++	+++
0.2	++	++	++
0.1	+	+	+
0.05	+	+	+
0.02	±	-	-

Estos resultados, indican que la actividad biológica de la fracción precipitada por sulfato de amonio al 25% no difiere de restante, hecho que demuestra que no hay purificación.-

4^o) Purificación por diálisis. La última tentativa purificación fué la de someter el producto a una diálisis e investigar mediante el método biológico, si aumentaba o disminuía su actividad.-

Para ello, se preparó una solución al 1%, se neutralizó y se la dializó durante cuatro días. El líquido resultante, se trató con ácido acético hasta llevarlo a pH 4 y el residuo obtenido se se-

de 1 v/v.

Luego se lo ensayó en la forma indicada anteriormente, comparando los resultados con una solución de producto original a la misma concentración (1%)

Concentración en ng/cm ³	Nucleo. original	Nucleop. dializada
0.5	+++	+++
0.2	++	++
0.1	+	+
0.05	±	±
0.02	-	-

Estos resultados indican que el producto original no pierde su actividad al dializarlo, ni tampoco la aumenta, vale decir que no es posible purificarlo mediante este procedimiento.-

Estas experiencias ponen de manifiesto que el producto que se obtiene cuando se precipita el extracto de B. anthracis en cloruro de sodio al 9%, disminuyendo el pH a 3.8-4, tiene una composición bastante homogénea. Dado la inestabilidad acentuada de las nucleoproteínas frente a los reactivos, no se tentaron otros métodos de purificación fuera de los ensayados, decidiendo por lo tanto efectuar su hidrólisis directamente y aislar los componentes fundamentales cuando fueran posibles.-

HIDROLISIS DE LA NUCLEOPROTEINA

Las experiencias de purificación, agotaron la cantidad de nucleoproteína que se disponía al iniciar los ensayos. Fue necesario sembrar nuevamente 50 litros de medio de cultivo y seguir la marcha indicada anteriormente para lograr reunir 1.18 g de producto seco. Con esta cantidad, se han efectuado los ensayos que se indican a continuación.-

Separación de ácido nucleico y proteína

Vedante una hidrólisis muy suave es posible separar el ácido nucleico, de la fracción proteica, sin que se produzcan alteraciones de importancia. Sin embargo, Johnson y Brown (32) trabajando con ácido tuberculínico notaron que el nucleótido correspondiente a la guanina, es más lábil que los restantes, separándose de ellos aún con tratamiento alcalino en frío; por ello, es necesario investigar esta base en el líquido que se obtiene al precipitar el ácido nucleico. Si bien en nuestro caso se ignoraba la presencia del nucleótido mencionado, se ha tenido en cuenta estos antecedentes al efectuar la hidrólisis definitiva, que se efectuó tratando la nucleoproteína, primero con agua destilada en frío, durante 24 horas antes de someterla al tratamiento alcalino. Previamente, sin embargo, se ensayó la separación de ácido nucleico-proteína, sobre una pequeña porción (0.15 g). Para ello, se la disolvió en frío, con solución de hidróxido de sodio al 3%. Después de 1 hora de reposo, la solución resultante se trató con ácido acético gota a gota, hasta obtener un precipitado abundante, que se separó por centrifugación. El pH del líquido sobrenadante era aproximadamente 3.6-3.8. El precipitado, se lavó con ácido acético diluido, luego alcohol finalmente éter. Se obtuvieron 0.072 g. de la solución acuosa obtenida al precipitar la proteína, se aisló el ácido nucleico. El resto, se solidificó inmediatamente agregando ácido clorhídrico.

trado hasta obtener una solución persistente, agregó un volumen de alcohol de 95% y se dejó reposar 24 horas. Todas estas operaciones se efectuaron a temperatura baja (inferior a 15°), a fin de evitar en lo posible la descomposición del ácido nucleico.-

Al día siguiente, se observó en el fondo del recipiente un precipitado blanco amarillento, que una vez separado por centrifugación se lavó con alcohol y éter. Su peso una vez seco fué de 0.007 g.-

Separada la nucleoproteína en estas dos fracciones, se efectuaron las siguientes reacciones:

	Biuret	Milton	Glioxílico	Presencia
Fracción proteica	+	+	+	-
Fracción ac. nucleico	-	-	-	+

Las dos porciones reunidas, sumaban en total 0.079 como se ve hay una pérdida en las operaciones de casi el 50 %, pérdida que de acuerdo a las observaciones de Johnson y Brown puede ser originada por la separación de un nucleótido durante el tratamiento alcoholico. Con el objeto de evitar en lo posible este inconveniente, se sometió el producto, tal se indicó anteriormente, a un tratamiento previo con agua destilada.-

1.03 de nucleo proteina pulverizado, se suspendió en 7 cm³ de agua destilada, durante 24 horas. Esta suspensión se centrifugó, separándose un insoluble (B) y un líquido ligeramente turbio (A) cuyo volumen era aproximadamente de 5 cm³. Este líquido, se trató gota a gota, con ácido acético obteniéndose un precipitado ligero, que se separó por centrifugación, se lavó con ácido acético diluido, luego alcohol y finalmente éter. (Fracción proteica I) Pendiente

to 0.0310 g.-

El líquido obtenido al centrifugar esta proteína, trató con ácido clorhídrico concentrado, hasta obtener una intensa opalescencia; luego se agregó un volumen de alcohol de 95% y se dejó en reposo 24 horas; estas operaciones se efectuaron a menos de 15°C. El ácido nucléico separado, después de centrifugado se lo lavó con alcohol y éter (Fracción ácido nucléico I) Rendimiento 0.0190 g.-

La solución que se obtiene al separar el ac. nucléico, como así también las provenientes del lavaje, se reservaron para investigar en ellas, la presencia de productos de descomposición del ácido nucléico.

Residuo B. Se halla constituido por la nucleoproteína insoluble en agua, se trató con 6 cm³ de solución de hidróxido de sodio al 3%, en el cual se disolvió casi totalmente, dando un líquido de color pardo obscuro.- Después de 1 hora se centrifugó, separándose un pequeño residuo (C) y una solución que se trató como anteriormente para separar proteína y ácido nucléico. La cantidad de proteína (II) obtenida en esta fracción es muy abundante (0.4540 g.). En cambio, el rendimiento de ácido nucléico (II) ha sido muy reducido (0.0096), lo que indica que la descomposición de este último es intensa cuando se trabaja en presencia de hidróxido de sodio. Como anteriormente, se lavaron los precipitados con alcohol y éter, habiéndose intensificado los lavados, a fin de eliminar en lo posible el acetato de sodio retenido por la proteína. Los líquidos obtenidos al precipitar el ácido nucléico, como así también los del lavaje de este, se reunieron con los provenientes del tratamiento del líquido (A).-

Residuo C A esta fracción se le hizo un segundo tratamiento con solución de hidróxido de sodio a mayor concentración (50

La disolución fue casi total obteniéndose solo un residuo insoluble (D), cuyo peso fue 0.0080 grms.-

Las operaciones se efectuaron en forma indicada anteriormente, habiéndose obtenido productos más coloreados y con el siguiente rendimiento a continuación:

Proteína III 0.0446 Acido nucléico III 0.0086

TOTAL DE LOS RENDIMIENTOS

<u>Nucleoproteína tratada.</u>				1.0300 g.
	I	II	III	TOTAL
Proteína	0.0310	0.4540	0.0446	0.5296
Ac. nucléico	0.0190	0.0096	0.0086	0.0372
			Residuo insoluble en NaOH	<u>0.0080</u>
			Pérdida	0.5728
				0.4542

INVESTIGACION DE LOS PRODUCTOS DE DESCOMPOSICION

DEL ACIDO NUCLEICO

Los rendimientos anteriores, comprueban nuevamente que el ácido nucleico se descompone en gran parte durante los procesos de separación.-

La investigación de los productos de descomposición, se han efectuado sobre los líquidos de precipitación y lavado de estos, que sumaban en total 270 cm³.-

Estos se evaporaron a presión reducida para eliminar el éter, alcohol y gran parte del ácido clorhídrico presente. El residuo obtenido, se diluyó en ácido sulfúrico al 15%, y luego se hidrolizó el líquido maría durante una hora. Aún caliente, se trató con amoníaco concentrado, gota a gota, hasta obtener un precipitado. Se agregó un exceso (2%) de amoníaco y se dejó en reposo 24 horas.-

El precipitado obtenido se centrifugó, se lavó con amoníaco diluido (1%) y se trató con agua caliente y la cantidad indispensable de ácido sulfúrico al 20% para disolverlo. Como la solución se hallaba fuertemente coloreada, se trató con negro animal, filtrándose después de 7 horas de reposo. En la solución incolora obtenida, se reprecipitó guanina con amoníaco concentrado y a ebullición. Después de 24 horas se centrifugó, lavándose con amoníaco diluido y secándose en estufa a 40 grados. La cantidad de guanina resultante fue de 4 mg.-

En el primer filtrado, obtenido al separar guanina, investigó la presencia de adenina.-

Para ello se acidificó debilmente con ácido sulfúrico diluido, se llevó a ebullición y después de agregar solución de nitrato de cobre al 10% se precipitó, gota a gota, con solución saturada de bisulfito de sodio. Se obtuvo un precipitado blanco amarillento,

separó por centrifugación. Se lavó por decantación y los sedimentos se trataron en agua caliente, se descompuso el derivado cúprico de las bases púricas, con hidrógeno sulfurado. Después de separar el sulfuro de cobre formado se decoloró la solución con carbón animal y se llevó a sequedad sobre baño maría. Se obtuvo un residuo blanco, que se trató en caliente con ácido sulfúrico al 5% separándose después de unas horas, cristales característicos de sulfato de adenina. Rendimiento 8 mg.-

Acido fosfórico: El ácido fosfórico liberado por la hidrólisis del ácido nucleico, fué investigado en el líquido obtenido al precipitar las bases púricas con sulfato de cobre y bisulfito de sodio.-

Esta solución se trató con ácido nítrico, nitrato de amonio y con molibdato de amonio; se obtuvo un abundante precipitado, amarillo de fosfomolibdato de amonio.-

REACCIONES DE COMPROBACION

A pesar de que las sustancias aisladas, se comportaron durante su separación, como guanina y adenina, se efectuaron además las siguientes reacciones de comprobación.-

Guanina

Reacción de la Murexida. (Sobre 1 mg) Debió ser positiva. Efectuada con la misma cantidad de guanina pura. dió con la misma intensidad.-

Diazo reacción. (34) Esta reacción permite diferenciar guanina de adenina. La sustancia disuelta en solución de hidróxido de sodio, se trata con una solución recién preparada de ácido diazobenzeno sulfónico. En caso positivo se desarrolla una intensa coloración roja.-

El reactivo se prepara en la siguiente forma: 2 gramos de ácido sulfanílico pulverizado se mezclan con 3 cm³ de agua y 2 cm³ de ácido clorhídrico concentrado. A la pasta resultante, se agrega en pequeñas porciones, una solución de 1 gramo de nitrato de potasio en 2 cm³ de agua; esta operación se efectúa en un minuto. Después del agregado de cada porción de nitrato, la mezcla se enfría con agua. La mayor parte del ácido sulfanílico se disuelve, obteniéndose a la vez un precipitado cristalino, blanco, del diazocompuesto. Se filtra y lava con agua destilada.-

Una pequeña porción del precipitado de guanina, tratado en la forma indicada anteriormente reaccionó en forma positiva intensa a los pocos minutos.-

Obtención del clorhidrato: Con la guanina remanente, después de efectuar las reacciones anteriores, se obtuvo el clorhidrato. Para él se trató en caliente con ácido clorhídrico al 5%. Se disolvió totalmente, separándose por enfriamiento, los cristales característicos del clorhidrato. (microfotografía N^o 1).-

Obtención del picrato.- El clorhidrato de guanina, obtenido anteriormente se disolvió en poca agua caliente y se trató con unas gotas de sol. de ácido pícrico. Al enfriarse se separaron cristales amarillo intensos, de picrato de guanina. (microfotografía N^o 2) Después de centrifugado se lavaron con agua fría, recristalizándose en la menor cantidad posible de agua caliente. La pequeña cantidad de cristales obtenidos, después de sacos, se usaron para determinar el punto de fusión.-

A los 190-200^o empezó a descomponerse; esta temperatura concuerda practicamente con la indicada para la de descomposición del picrato de guanina.-

La misma sustancia preparada a partir de guanina para

316 r's o 3000 temperatura fusión (1,0-200)

Adenina

Los cristales sulfato de adenina se disolvieron un poco de agua caliente y la solución obtenida, se trató gota a gota con sol. de ácido pícrico. Se obtuvo un precipitado amarillo (microfotografía N° 3) que, después de ser filtrado por nueva cristalización en agua caliente, se le determinó temperatura de descomposición.- El dato obtenido 270-275° concuerda con el asignado a esta sustancia.-

HIDROLISIS DE LA FRACCION PROTEICA

De los 0.5296 g. de proteína obtenidos en total, al separar ácido nucléico, se pesaron 0,50 g. (previamente calentados a 60°C y enfriados sobre P₂O₅) para efectuar su hidrólisis y determinar las diferentes fracciones de nitrógeno. El resto se usó para determinar carbono e hidrógeno según micro Pregl, (1), e investigar además triptófano. Los resultados obtenidos en la hidrólisis, como así también los de carbono e hidrógeno, no deben considerarse los reales, dado que la proteína hidrolizada es una mezcla de las tres fracciones separadas, y probablemente se hallan impurificadas con algo de ácido nucléico. Si bien debería haberse purificado antes de hidrolizarla, ello no se hizo en virtud a poca cantidad de sustancia disponible. La hidrólisis según Van Slyke en siete fracciones nitrogenadas requiere tres gramos de proteína: con menor cantidad de sustancia (1 gramo) se pueden expresar los resultados de la hidrólisis en 4 grandes grupos, que es lo que hemos hecho.-

0.50 g. de sustancia, se hidrolizaron durante nueve horas con ácido clorhídrico 1:1, a ebullición. El producto resultante, una vez frío, se destiló a presión reducida (40°C) hasta reducir su volumen a 2 cm³ aproximadamente. Se llevó a 100 cm³ con agua redestilada, tomándose dos muestras de 10 cm³ c/u para determinar nitrógeno total según Kjeldahl. Resultados. 15.20 % y 15.24 %.-

(1). Estas determinaciones fueron efectuadas en Alemania por el Dr. I. Drishans.-

A los 80 cm³ restantes se los trató con lactato de magnesia exenta de amoníaco, destilándose al vacío el amoníaco liberado, que corresponde al N. amónico. Resultado 1.42%.-

La suspensión de magnesia, ligeramente coloreada en verde, se filtró y lavó con agua redestilada caliente; en el precipitado se determinó N por Kjeldahl, correspondiendo este resultado al N húmico, retenido en su totalidad por la magnesia. Resultado 0.62%.-

La solución y líquidos de lavado, se concentraron a 70 cm³ aproximadamente y se trataron con ácido fosfotúngstico (Flin-ner. The Chem. C nst. of the Proteins). Después de 36 horas de reposo, se filtró el precipitado obtenido, lavándose con solución de ac. fosfotúngstico. La determinación de N efectuada sobre este precipitado, corresponde al de los dianinoácidos y dió por resultado 2.10%. Por diferencia se obtiene el correspondiente al de los monocarinoácidos. 11.06

RESULTADOS DE LA HIDROLISIS PROTEICA

Nitrógeno total	15,20 %
" amónico	1,42 "
" húmico	0,62 "
" dianinoácidos	2,10 "
" monocarinoácidos	11,06 "

ANALISIS DE LA LECTINA:

Carbono	52,31 %
Hidrógeno	6,94 "
Nitrógeno	15,20 "

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ÁCIDO
NUCLEICO Y PROTEÍNA EN L. B. ANTRACIS

Las diferentes fracciones de ácido nucleico y de proteínas separadas mediante la técnica antes mencionada, se ensayaron los efectos de investigar en ellas poder precipitógono.-

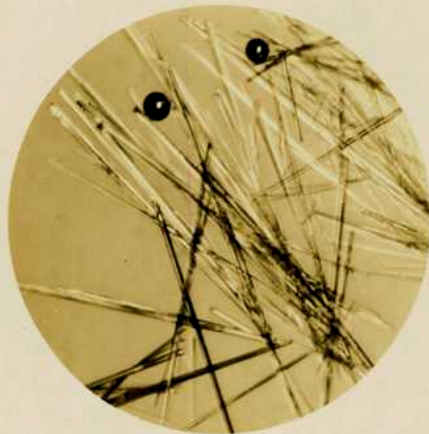
Para ello, se disolvieron en solución muy diluida de hidróxido de sodio, en forma tal, que el pH de las soluciones resultantes no pasara de 8.- Se diluyeron convenientemente con solución fisiológica hasta llevarlas a una concentración de 1:10.000 y se trataron el suero de un caballo previamente inactivado con la fracción nucleoproteica.-

Los resultados obtenidos se consignan en el siguiente cuadro:

Acido nucleico I		±
" "	II	0
Proteína	(I, II, III)	+
"	I	±
"	II	±

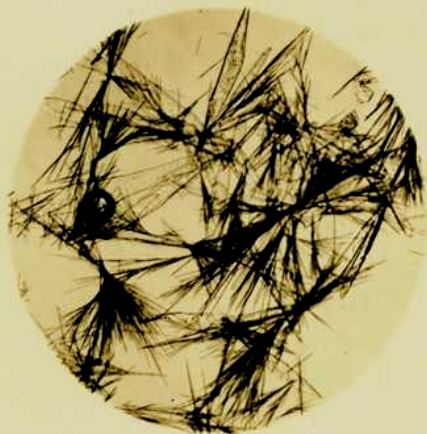
Observaciones: La fracción ácido nucleico II y proteína II no se disolvieron totalmente.-

MICROFOTOGRAFIA N^o 1



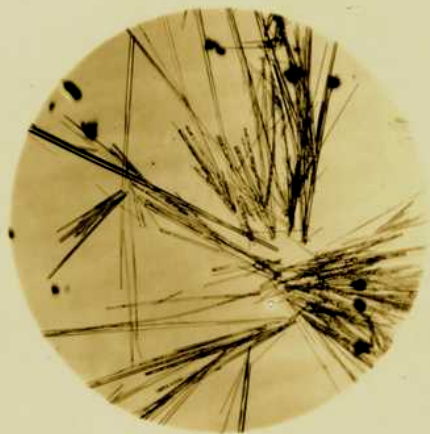
Cristales de clorhidrato de guanina.-

MICROFOTOGRAFIA N° 2



Cristales de picrato de guanina.-

MICROFOTOGRAFIA N^o 3



Cristales de picrato de adenina.-

Estos ensayos deben ser nuevamente efectuados, verificando la intensidad mediante precipitaciones sucesivas, con la fracción, los efectos de eliminar en ellas las sustancias adsorbidas que pudieran contener.- Por otra parte, el lavado con alcohol efectuado con el objeto de secarlas rápidamente y evitar su descomposición, tiene una acción evidentemente nociva sobre el poder antigénico de las proteínas.-

Por ello, deben considerarse con reserva los resultados obtenidos en los ensayos de acabados de reaccionar, especialmente en lo que se refiere a la actividad precipitógena de la fracción I de ácido nucléico.-

-CONCLUSIONES-

La fracción del B. anthracis soluble en solución fisiológica y precipitable a pH 3,8-4, es como lo supusieron los autores que la estudiaron desde el punto de vista biológico, una nucleoproteína.-

Después de unos ensayos de purificación se ha desdoblado esta nucleoproteína, en ácido nucléico por una parte y proteína por la otra, habiéndose estudiado separadamente.-

El ácido nucléico tiene entre sus componentes dos aminopurinas, guanina y adenina cuyos nucleótidos correspondientes se liberan del resto del ácido nucléico con suma facilidad.-

La fracción proteica ha sido analizada, habiéndose determinado el contenido de las distintas clases de nitrógeno que la constituyen y su porcentaje de carbono e hidrógeno.-

El poder antigénico de la nucleoproteína reside probablemente en la fracción proteica, pero debido al tratamiento con alcohol que ha sido sometida durante su separación, no se ha podido establecer en forma terminante esta suposición.-

Este trabajo de tesis ha sido efectuado en el Laboratorio de Química Biológica de la Facultad, bajo la dirección del Prof. Dr. Alfredo Sordelli a quien agradezco todas sus indicaciones y consejos.-

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Folia biológica. Números 11,12,13,20,21,26 y 27.-
- 2.- Id 11,12 y 13.-
- 3.- Id 11,12 y 13.-
- 4.- Rev. del Dep. Nacional de Hig. Año 1930.-
- 5.- Folia biológica N° 20,21,22.-
- 6.- Id 26 y 27
- 7.- Bull. John. Hopk. Hosp. 33,151 (1922).-
- 8.- Zentr.fur Bakteriolo.Abt. 2,21,620 (1908).-
- 9.- Nucleic Acids. Levene-Bass. 1930.-
- 10.- Military Acad.Med. 1912.-
- 11.- Patológica. 3,381, (1913).-
- 12.- Sperimentale 79,289, (1925).-
- 13.- Z.Hyg.45,187, (1906).-
- 14.- Zentr.Bioch.Biophys. 10,294, (1910).-
- 15.- Rif.Med. 141, (1913)
- 16.- Zent.Bakt.Parasiten. 67,225, (1912)
- 17.- Rend.adunanza acad.med.fis.florentina. 76,262,(1922)
- 18.- Sperimentale 79,289,(1925).-
- 19.- Nucleic Acids. Levene-Bass. (1930).-
- 20.- Amer.Rev.tubercul.4,842,(1921).-
- 21.- Bull, Johns Hopck.Hosp. 23, 151, (1922).-
- 22.- J.Amer.Chem.Soc. 45,1823, (1923).-
- 23.- J.Biol.Chem. 63,225, (1923).-
- 24.- Z.f.physiol.Chem. 87,85, (1913).-
- 25.- Journ.Immunol.16, 223,(1930).-
- 26.- J.Experim.Med.54,515,(1931).-
- 27.- Arch.f.Kinder.30,23,(1906).-

- 28.- Z.physiol.Chem. 25,48,(1898).-
- 29.- Münch.Med.Wochenschr.66,1412 (1919).-
- 30.- Zentr.Bact.Parasiten.44,440,(1906).-
- 31.- Pathologica.95,(1912).-
- 32.- J.Biol.Chem.90,57,(1931).-
- 33.- J.Biol.Chem.54,731,(1922).-
- 34.- Nucleic Acids.Lavigne-Bass.(1930).-