

Tesis de Posgrado

Ensayos de purificación del antígeno heterogenético

Somoza, Ramón D.

1937

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:

Somoza, Ramón D.. (1937). Ensayos de purificación del antígeno heterogenético. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0218_Somoza.pdf

Cita tipo Chicago:

Somoza, Ramón D.. "Ensayos de purificación del antígeno heterogenético". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1937.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0218_Somoza.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



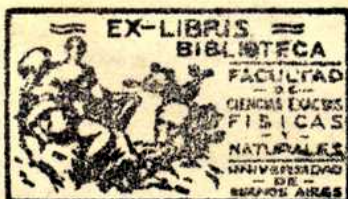
UBA

Universidad de Buenos Aires

ENSAYOS DE PURIFICACION
DEL ANTIGENO HETEROGENETICO

Tesis para optar al título
de Doctor en Ciencias presen-
tada por el ex-alumno Sr. Ra-
món D. Somosa a la Facultad
de Ciencias Exactas, Físicas
y Naturales.

Tesis: 218



Buenos Aires, diciembre de 1937.

La realización del trabajo que ahora cometo a la consideración de los señores Profesores, estuvo bajo la dirección del doctor Venancio Leulofou, a quien estoy sinceramente agradecido, como así mismo al doctor Alfredo Soricelli por sus consejos y haberme gentilmente permitido disponer de los laboratorios del Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene.



Fuó Forssman quien en 1911 descubrió inyectando conejos por vía parenteral con extractos de órganos de cobayo, la presencia en estos de un antígeno caracterizado por la aptitud de originar hemolisinas de glóbulos rojos de cabra (posteriormente se halló que también hemolizaban los glóbulos rojos de oveja), hemolisinas que tenían una actividad del orden de las obtenidas inyectando glóbulos rojos de oveja en conejo.

La experiencia de Forssman, que relaciona inmunológicamente dos especies de mamíferos de órdenes distintos (cobayo y cabra) modificó las ideas que sobre especificidad existían en los comienzos de la inmunología, aunque ya ciertas observaciones anteriores indicaban que anticuerpos para seroproteínas de una especie también reaccionaban con seroproteínas de especies filogenéticamente relacionadas.

La presencia de antígeno generador de hemolisinas para glóbulos rojos de oveja fuó posteriormente precisada en caballo, gato, perro, cabra, hombre (grupo sanguíneo A o AB), rata blanca, pollo, tortuga, ciertos peces, algunos tipos de bacilos paratífoides, bacilo Shiga y pneumococos; pero se pudo demostrar

que no existe en buey, rata, conejo, hombre (grupo sanguíneo O y B), cayo y bacilos tifoide. (Un resumen véase en Bushbin-der (1935)). Es a esta distribución tan arbitraria a la que debe su nombre de heterogénico o heterófilo este grupo de antígenos, aunque también es corriente designarlo con el nombre de antígeno de Forssman.

Los antígenos de Forssman de distintos orígenes pueden diferir entre sí, pero es norma que las hemolisinas de sangre de oveja originadas por el antígeno deben ser totalmente fijadas por los órganos de otros animales que puedan engendrarlo, para considerar ese antígeno del tipo Forssman. A esto se ajusta perfectamente el antígeno contenido en el riñón de caballo.

Este antígeno de Forssman posee propiedades particulares que lo hicieron especialmente apto para los estudios químicos. Deerr y Fick (1913) demostraron su estabilidad a la ebullición en baño maría hirviente o ebullición de suspensiones de los tejidos conteniendo el antígeno, una propiedad poco común a los demás antígenos entóxicos conocidos, que en su mayor parte eran termolábiles.

Químicamente, el antígeno de Forssman presentó una propiedad que fue indicada por vez primera por Serdelli y Fischer (1926). Estos autores señalaron que si se extraía riñón de perro o conejo, o glóbulos rojos de oveja o cabra, con alcohol y alcohol-

-éter, la substancia que confiere a esas células la propiedad de fijar la hemolisina heterogénica que había sido ya determinada por Forssman en sus primeros trabajos se encuentra en la porción soluble en los disolventes orgánicos, mientras que los residuos la han perdido casi totalmente. Estos resultados fueron confirmados posteriormente por diversos autores: Georgi (1919), Friedberger y Sute (1919), Taniguchi (1921). Los mismos autores encontraron que la desviación o fijación del complemento por el antígeno de Forssman y el antioceptor específico se debe a la parte soluble en alcohol-éter, pero que en cambio, había perdido toda propiedad inmunizante.

Esta contradicción entre las propiedades in vivo e in vitro hacía decir a los autores: "puede existir un antígeno con poder de fijación para ciertos anticuerpos, pero que es incapaz de engendrarlos por carecer de una nueva propiedad que es el poder de irritación". Como ha dicho Brunius (1936) "por esta simple operación -tratamiento con alcohol- se establece ^{de} que los antígenos de Forssman se puede separar una fracción inactiva que es la portadora de la inmunidad específica, puesto que da las reacciones características con los anticuerpos de Forssman y además que esta fracción es probablemente de naturaleza no proteica".

Lansteiner, que conjuntamente con Lampi (1917-1918) había encontrado que el substancias químicas de naturaleza simple, ad-

quieran carácter antigénico cuando se las combina con una protefina extraña al animal que se inmuniza, demostró (1921; Landsteiner y Himm, 1923) aplicando esa técnica al antígeno heterogénico que inyectando a conejos la porción soluble en alcohol del antígeno de Forssman, mezclada con suero de corde, se obtenían hemolisinas para glóbulos de oveja, con títulos elevados.

La porción soluble en alcohol fue denominada haptene por Landsteiner, quien consideraba así al antígeno de Forssman formado por dos porciones; el componente activo o haptene no protéico y el componente no específico que sería de naturaleza protéica.

Doerr y Hallauer (1925) probaron que en la inmunización combinada, la protefina añadida al haptene podía ser de la misma especie que se inmunizaba y Gonzalez y Arzangul (1931) llegaron a suplantar a la protefina, adsorbiendo el haptene Forssman ^{principalmente} sobre caolín o carbón, pero en preparaciones bien purificadas del mismo, con estos soportes inorgánicos (Landsteiner y Jacobs, 1932, 1933, 1934) no ha podido obtenerse hemolisinas al inyectarlo.

La mayor parte, sino todas, de las investigaciones químicas realizadas sobre el antígeno de Forssman se refieren a tentativas para dilucidar la constitución de la porción soluble en alcohol, que como demostraron Bordelli y Fischer (1918), posee propiedades antigénicas in vitro. Se trata pues, por fraccionamiento del extracto bruto, de obtener al estado de especie química pura la substancia que le confiere tal actividad.

Que las investigaciones se encaminaran en ese sentido no debe sorprender, puesto que la otra porción, la proteínica, no es específica y por lo tanto de menor interés desde el punto de vista inmunológico. Del punto de vista químico, la coestabilidad de esa porción, hallada por Doerr y Pick (1913) facilita en gran parte los trabajos de purificación de la substancia activa.

Los primeros ensayos de purificación de esa porción fueron realizados por Wernicke y Bordelli (1919) quienes demostraron que el principio fijador era insoluble en acetona y éter, en cloroformo, benceno, toluol y que el preparado tenía nitrógeno y fósforo.

Luego Cordelli, Fischer, Wernicke y Rice (1921) anunciaron que aplicando el método de Leven y Rosenheim ^{para} el fraccionamiento de cerebrósidos, se encontraba una fracción de la cual 0.12 mg. fijaban 50 dosis hemolíticas de suero.

Taniguchi (1921) demostró su precipitación por la acetona, aunque sostuvo que era soluble en éter, lo que luego no se pudo confirmar.

A igual resultado sobre la precipitación por acetona llegó Meyer (1921).

En 1924, Cordelli, Wernicke y Schulze hicieron nuevos ensayos de purificación del antígeno. Aplicaron el método de Rosenheim para la preparación de cerebrósidos, al riñón de caballo, encontraron que el antígeno era soluble en piridina y obtuvieron una fracción de la cual 1.6 γ fijaban 4 dosis hemolíticas. El ulterior fraccionamiento con alcohol-cloroformo no aumentó la pureza. Al intentar fraccionar con piridina un precipitado de su suspensión con acetato de plomo, hallaron que la porción soluble fijaba más que la insoluble, pero al querer purificarla aún más, el poder fijador no aumentó, posiblemente porque al eliminar lípidos inactivos por sí, disminuía la actividad fijadora de la porción antigénica, que es incapaz de fijar sino cuando está mezclada con otras sustancias lipídicas.

Establecieron que el comportamiento del antígeno frente a los diversos disolventes orgánicos no es neta, lo que impide su clasificación segura dentro de los grupos de lípidos éncelidos.

También usaron riñones de caballo como fuente de antígeno heterogéneo Landsteiner y Levene (1925), quienes lo extrajeron con alcohol caliente que por reposo en frío dejaba una sustancia que agotaban con éter y hervían después en cloroformo, separando una solución de la que precipitaba una fracción por agregado de alcohol. Por una serie de soluciones y precipitaciones con alcohol obtuvieron otras fracciones que tenían fuerte, pero aproximadamente igual poder de fijación de complemento, que no indican cuantitativamente los autores y esa actividad podía ser aumentada por agregado de lípidos del cerebro de buey, especialmente esfingocelina cruda. eran solubles en agua, insolubles en éter, alcohol, ^{hío} acetona y cloroformo. Reacción de biuret negativa. Hidrolizadas con ácido clorhídrico daban sales insolubles en agua y una sustancia reducida que dió una osazona dextrógira.

Posteriormente Landsteiner y Levene (1926), continuando ese trabajo, emplearon el fraccionamiento con piridina y precipitaron la parte soluble con acetona, luego utilizaron et-

tedos especiales de separación, como la disolución en benceno y precipitación por alcohol o la precipitación por reactivo de Fehling. En todos los casos pudieron separar fracciones que fijaban el complemento en alta dilución, que contenían C, H, O, N y que por hidrólisis con ácidos daban sustancias reductoras.

La parte química de estos trabajos puede considerarse condensada en el publicado a fines de 1927 por Levene y Janisteiner quienes partiendo de riñón de caballo que extraían con alcohol y cuyo extracto alcohólico bruto purificaron por éter, llegaron a obtener de este extracto purificado por digestiones en piridina caliente, disolución en mezcla de cloroformo y alcohol metílico y precipitaciones con acetona, tres fracciones: una que como la goma animal precipita de su solución acuosa por agregado de solución de Fehling. No tiene fósforo ni azufre. Otra insoluble en agua, tiene azufre, pero no fósforo. Y la tercera que tiene fósforo, pero no azufre, es soluble en álcali diluido, pero no en agua. Estas fracciones se diferenciaban además, por su reacción frente al reactivo clorhídrico, orcina-cobre, pues mientras la primera y segunda daban la coloración verde habitual, la tercera daba una coloración rojo púrpura. Los análisis elementales que publican, señalan una gran variación en la composición de

fracciones que por su preparación debían ser idénticas y aunque no informan sobre su poder fijador, es evidente que se trata de sustancias que a juzgar por lo explicado en sus trabajos anteriores, deben poseerlo muy elevado.

No se encuentran otros trabajos sobre la purificación del antígeno heterogéneo hasta llegar al de Combiensio y sus colaboradores (1930) quienes aislan el producto activo de riñones de caballo y de cobayo según P. Bruce White con ácido acético y con antiformina según Furth y Landsteiner. Los dos productos examinados no daban reacciones de proteínas. Era positiva la reacción de Molisch, pero muy débil la de sustancias reductoras, más intensa sin embargo, en el producto proveniente de riñón de caballo. Ambas eran dextrorrotatorias, no daban osasomas ni reacción positiva de pentosas. Por hidrólisis aumentaba el poder rotatorio y en forma apreciable, el poder reductor y del líquido madre podían obtenerse osasomas de igual aspecto tanto para el producto obtenido de riñón de caballo como para el obtenido de riñón de cobayo.

Nuestro trabajo fue iniciado con la idea de realizar ensayos encaminados al hallazgo de métodos que permitieran purificar la porción específica del antígeno de Forssman, con el fin de comenzar a estudiar sus productos de hidrólisis.

Cuando se había realizado una parte del mismo aparecieron los trabajos de Brunius (1936) condensados posteriormente en su tesis (1936) que trae en detalle una larga serie de experiencias realizadas por dicho autor para tratar de purificar el antígeno heterogéneo. Ensayó la extracción inicial de los riñones de caballo, fuente que empleaba para el antígeno, con solución fisiológica caliente, con solución salina fría en caliente y con hipoclorito de sodio, sin obtener mejores resultados que con el alcohol, disolvente al cual volvió posteriormente. Probó igualmente la adsorción por hidróxido férrico coloidal y diversos tipos de hidróxidos de aluminio sin obtener ventajas desde el punto de vista de la separación y terminó empleando la extracción alcohólica de riñones previamente coagulados por calor, secados y extraídos por acetona, que por supuesto elimina los lípidos solubles en ella. Los extractos alcohólicos así obtenidos son relativamente impuros, necesitándose 25 γ para inhibir la hemólisis de una dosis hemolítica, pero Brunius encontró que se lograba una purificación inicial rápida por saponificación de los mismos, pues el álcali empleado (0.1 N) no destruye el antígeno y eliminaba las impurezas. Obtiene así fracciones que inhiben con 1 γ una dosis hemolítica, pero que ya requieren la adición de lípidos extraños para actuar como fijadores, posiblemente porque en la saponificación se han des-

compuesto los que acompañan al antígeno, sin ser activos, aumentan notablemente su capacidad fijadora y a veces son los únicos capaces de revelarlas. Luego, por el fraccionamiento en piridina confirman lo ya mencionado por otros autores para antígenos con lipoides; que este se concentra en la fracción soluble, obteniendo Brunius, fijación de una dosis hemolítica con 0.16 a 0.24 γ del mismo. De estas porciones solubles en piridina, llega a obtener productos aún más activos, por ebullición de las mismas con acetona (la porción activa siendo insoluble) o por precipitación con este disolvente de otras soluciones (piridina, alcohol metílico ácido). La cantidad que fija una dosis hemolítica está entre 0.075 y 0.033 γ valer máximo de concentración a que ha llegado dicho autor.

Al estudiar las propiedades y el comportamiento de las diversas fracciones, Brunius encuentra que a medida que aumenta la proporción de azúcar animal presente en los preparados, aumenta su poder fijador, que las enzimas proteolíticas no actúan sobre ellas, que el veneno de cobra tampoco las modifica y que no se destruyen por acción del ácido nitroso ni del isocianato de fenilo. En cambio eran modificadas, eliminando su poder fijador, por tratamiento con diazometano.

El presente trabajo que fuera comenzado, como ya se ha mencionado, antes de las publicaciones de Brunius(1936), es una tentativa más para lograr fracciones altamente activas del antígeno heterogénico.

En primer lugar, se trató de fraccionar el antígeno empleando piridina, disolvente que Sordelli, Wernicke y Deuloffen (1924) habían encontrado disolvía de preferencia una fracción activa, lo cual fuera confirmado por Levene y Landsteiner (1927). Para el fraccionamiento ulterior se emplearon mezclas de cloroformo-álcohol metílico en la forma indicada por estos últimos autores.

Los ensayos de medición que se detallan en la parte experimental, señalan que en estos fraccionamientos no se produce ninguna considerable purificación del antígeno, antes bien, en algunos casos disminuye su actividad fijadora, aunque esta aumenta por adición de esfingomielina. Estos hechos, confirmados en otras tentativas de purificación por disolventes, se explicarían si se admite que por medio de ellos se eliminan del antígeno bruto lípidos no fijadores, como se comprueba al ensayarlos, pero que poseen la propiedad de

exaltar la fijación por parte de la porción activa, llegándose así a la conclusión paradójica que a medida que se eliminan del antígeno bruto sustancias inactivas, su actividad propia disminuye. Esta actividad suele aumentar y entones sobrepasar la original, cuando se adiciona esfingomielina.

Como el fraccionamiento ulterior según el método de Landsteiner y Levene no resultara halagador en sus rendimientos de la porción activa, lo aplicamos solamente al extracto inicial, purificándolo por tratamiento con éter que extrae una regular cantidad de sustancias inactivas, como lo hemos podido comprobar y al producto privado de lípidos solubles en éter que tiene un poder fijador entre 1.5 y 2 γ , le aplicamos el método empleado por Wals (1927) para el estudio de los lípidos del bazo y en especial de la queratina. Este método fue aplicado por que este autor obtuvo por su fraccionamiento, sustancias que daban con orcina, clorhidrato y cloruro férrico, una coloración rojo violácea en lugar de verde como los cerebrosidos. Esta coloración rojo violácea en algunos casos ha sido dada por fracciones de alto valor fijador (véase p. ej. Levene y Landsteiner (1927)). El método de Wals consiste fundamentalmente, como puede verse en la parte experimental, en el empleo selectivo de mezclas de cloroformo-alcohol metílico en proporciones variables.

La purificación lograda no es considerable y solo llegó a alrededor del doble de la original en dos casos (fracciones F9, cuadro IX y F10, cuadro X) en que se logró fijación de dos dosis hexofíticas con 1 Y de antígeno, cuando el extracto bruto fija entre 1,5 y 2 Y habitualmente.

A menudo, en el proceso de purificación, se encuentran modificaciones contradictorias en la fijación, que deben atribuirse a disminución o aumento de la porción lipídica que exalta el poder fijador. Todos estos hechos nos hacen manifestar que los ensayos efectuados en esta forma, conteniendo el antígeno lipídico extraño que actúan como activadores, no dan más una verdadera idea del contenido real de antígeno de las porciones dadas y que solo cuando se parte de fracciones donde la actividad fijadora se ha perdido por completo, como ocurre en las experiencias de Brunius, los resultados son comparables, pues no se introduce entonces el error que deriva de la presencia de lípidos en cantidad descomunal en las diversas fracciones.

PARTE EXPERIMENTAL

Preparación y Dosis del Suero Conteniendo

Anticuerpo Heterogéneo

Des filones de caballo recién extraídos, se suspendieron en 20 cc. de solución fisiológica por disgregación en mortero y se inyectó 1 cc. de la suspensión en la vena marginal de la oreja de conejos grandes. Transcurrida una hora se inyectó otros 2 cc. y de nuevo a la hora, 2 cc. En total 5 cc. Se repitió este tratamiento otras dos veces, transcurriendo primero un día de intervalo y después dos días. Transcurridos cinco días se les extrajo totalmente la sangre por la vena yugular en forma aseptica, separando el suero por el método habitual. No es conveniente sobrepasar ese período porque disminuye el título. Los conejos resisten en general este método de inmunización, aunque algunas veces se producen shocks y mueren rápidamente.

La titulación se hizo en la forma corriente de acuerdo a lo indicado en el siguiente cuadro, colocando en una serie de tubos 0.5 cc. de diluciones crecientes conocidas de suero

conteniendo anticuerpo heterogénico, agregando a cada tubo 0.5 cc. de suspensión al 10 % de glóbulos rojos de oveja y 1 cc. de solución de complemento diluido 1:20, observando la hemólisis después de permanecer los tubos 30 minutos en baño a 37°.

Cuadro I

Tubos	Suero 0.5 cc. Diluciones	Glóbulos 10 % cc.	Complemen. 1:20 cc.		Suero I	Suero II
1	1/100	0.5	1	30 minutos a 37° C.	h	h
2	1/200	0.5	1		h	h
3	1/400	0.5	1		h	h
4	1/600	0.5	1		ch	ch
5	1/800	0.5	1		ch	fn
6	1/1000	0.5	1		fn	fn
7	1/1500	0.5	1		fn	fn
8	1/100	0.5	1 (suero f.)		o	o

Ambos sueros se mezclaron asignándose un título hemolítico de 1/600. (0.5 cc. de una dilución del suero 1/600 con solución fisiológica, contienen una cantidad de anticuerpo suficiente para producir hemólisis completa en media hora, en una mezcla con 0.5 cc. de suspensión de glóbulos rojos de

oveja al 10 % y 1 cc. de solución de complemento diluido 1:20. El suero titulado se conservó en ampollas en heladera, utilizándose en todo el transcurso de la experiencia.

Demaje del Antígeno

La actividad antigénica de cada una de las fracciones obtenidas, se determinó estableciendo su capacidad de fijar el anticuerpo heterogénico presente en el suero obtenido inmunizando conejos con riñón de cobayo. Al fijar el anticuerpo heterogénico, se inhibe la acción de este sobre los glóbulos rojos de oveja que serían hemolizados en presencia de complemento. Si una porción del anticuerpo hemolizante queda libre, actuará sobre una porción de los glóbulos que se añaden a la solución donde se realiza la fijación y lo harán en forma tanto más intensa, cuanto más quede libre.

En la práctica se coloca en una serie de tubos 0.1 cc. de diluciones de suero con anticuerpo heterogénico conteniendo dos dosis hemolíticas, luego se añaden dosis crecientes de antígeno a cada tubo, se completa a 0.5 cc. con solución fisiológica y se deja una hora a 37°, agitando cada media hora. Terminada la fijación del anticuerpo por el antígeno, se añade el sistema indicador formado por 1.5 cc. de

una muestra de 1/3 de glóbulos rojos de oveja y 2/3 de complemento diluido 1:20, que es el mismo volumen y muestra empleada en la titulación del anticuerpo. Se deja luego 30 minutos a 37° y se lee la hemólisis producida.

El siguiente cuadro, que se refiere a una experiencia particular (extracto inicial de riñón), ilustra los resultados obtenidos.

Cuadro II

Tubos	Suero 1/60 cc.	Suspensión extr. als. riñón caballo 1 cc. = 10 γ	Serum. fis. cc.	1 v. gl. 10% 2 v. cc. 1:20 cc.	Hemol.
1	0.1	0.4 cc. 4	---	1.5	0
2	0.1	0.3 " 3	0.1	1.5	0
3	0.1	0.25 " 2.5	0.15	1.5	0
4	0.1	0.2 " 2	0.2	1.5	0
5	0.1	0.15 " 1.5	0.25	1.5	vh
6	0.1	0.1 " 1	0.3	1.5	lh
7	0.1	0.05 " 0.5	0.35	1.5	jh
8	0.1	0.025 " 0.25	0.375	1.5	h

El valor interesante es aquel que con la menor cantidad de antígeno inhibe totalmente la hemólisis y representa la

cantidad misma de antígeno capaz de saturar dos dosis hemolíticas de anticuerpo heterogénico. En todos los casos se usó como testigo un tubo conteniendo la misma cantidad de suero que se colocaba en los tubos con antígeno y al cual, después de la fijación, (1 h. a 37°) se añadía la mezcla glóbulos rojos-complemento en la misma forma que a los demás.

Preparación de Vacuna Esfingomielina-cerebrósidos

Como Levene y Landsteiner (1925-1927) manifiestan en algunas de sus publicaciones que el agregado de esfingomielina cruda, que por sí misma no tiene actividad fijadora en ensayos con anticuerpo heterogénico, aumenta sin embargo la fijación con antígeno de Ferrman, hemos creído conveniente hacer un preparado de esfingomielina cruda a partir de cerebro de buey. Para ello se extrajo repetidas veces con, aproximadamente, 0.7 veces su peso de acetona, una parte en peso de cerebro de vacuno finamente dividido, dejándolos en contacto cada vez, durante 24 horas a la temperatura ambiente, agitando de vez en cuando. Cada porción de acetona fué decantada y filtrada por gasa fina. Esto se

repetió cuatro veces, finalizándose la extracción en un Schmet hasta cuando por evaporación de la acetona no quedaba un residuo apreciable. Este tratamiento separa grasas, ácidos grasos, colesteroína y sales y extrae el agua que dificultaría las operaciones siguientes.

Previa la evaporación de la acetona al vacío, el cerebro se pulverizó ligeramente y extrajo en Schmet con éter de petróleo que completa la extracción de las grasas. El producto seco, de nuevo se extrajo en Schmet con éter sulfúrico que disuelve lecitina y cefalina. Por cada parte del residuo seco, por evaporación del disolvente al aire, se agregaron doce partes de una mezcla de alcohol metílico y cloroformo en proporción 3:1, hirviendo y filtrando en caliente. Este líquido se concentró al vacío, agregándose después 10 partes de acetona y dejando reposar en heladera. Obtuvose así un precipitado que, separado por centrifugación y secado al vacío, se utilizó para las experiencias.

Esta mezcla esfingocelina-cerebrósidos es la que se agregó a las fracciones antigénicas en los ensayos tendientes a activar su poder fijador.

Preparación del Antígeno Bruto

Se utilizó como fuente de antígeno heterogéneo, riñón de caballo y se extrajo de estos según el método indicado por Landsteiner y Lavena (1925) con ligeras modificaciones.

Los riñones frescos de caballo, fueron secados a 60° al vacío y luego molidos regularmente fino. Por cada parte de polvo de riñón se agregó aproximadamente una y media partes de alcohol de 96°, calentando hasta ebullición que se mantenía durante tres a cinco minutos, en baño de vapor y con frecuente agitación. Esta solución alcohólica de lípidos era rápidamente filtrada en caliente y el tratamiento con alcohol, repetido de tres a cinco veces. Como se observó que los extractos finales por enfriamiento no daban casi precipitados, se fijaron en experiencias posteriores, en tres las extracciones a realizarse.

Todos los extractos alcohólicos reunidos se dejaron en cámara a 1°C, 24 horas, obteniéndose así un precipitado que fue centrifugado en frío y luego secado al vacío. La sustancia activa precipita prácticamente en forma total, pues los

líquidos alcohólicos dejaban aún, por evaporación, una sustancia que ensayada no manifestaba apreciable poder fijador.

El precipitado de los extractos alcohólicos previamente secado, fué privado de las sustancias solubles en éter, por agitación con éter sulfúrico anhidro durante varias horas, separando el insoluble por centrifugación y repitiendo la purificación con éter hasta que este no dejaba sino vestigios de residuo por evaporación. En este sentido, hemos podido confirmar lo ya manifestado por Ernste y Bordelli (1919), Bordelli, Vernicke y Deulefen (1925), Lanzsteiner y Levene (1927), que el llamado lipéide que actúa como antígeno heterogénico, es insoluble en éter.

Finalmente, el producto se secó al vacío y pulverizó, presentándose como un polvo blanco, algo higroscópico, poseyendo una apreciable actividad púls 2 y fijan dos dosis hemolíticas de anticuerpo.

Ensayo de Purificación

Se hizo un ensayo inicial de purificación que consistió principalmente en un primer fraccionamiento con piridina, como hicieron Serdelli, Wernicke y Deulofeu (1924). La porción soluble es siempre más activa que la insoluble. La parte soluble recuperada por evaporación, se trata con una mezcla 1:1 de cloroformo y alcohol metílico, recogiendo-se la fracción insoluble.

En la experiencia realizada hemos confirmado que se produce una relativa separación, pues la parte soluble en piridina tiene mayor poder fijador que la otra, haciendo las separaciones, tanto sin añadir, como adicionando esfingemielina. A pesar de todo, no se puede decir que haya un purificación de la sustancia, pues la porción soluble en piridina, comparada con el extracto original, no tiene un poder fijador mayor, sino por el contrario, algo menor y recién con la adición de esfingemielina, se nota un pequeño aumento en la intensidad de la fijación. (Cuadro III).

Se ve claramente en esta experiencia que 2 γ del extracto que podemos llamar bruto, fijan totalmente 2 dosis hemif-

Cuadro III

Cantidad en γ	4	3	2.5	2	1.5	1	0.5	0.25
Extr. Riq.	0	0	0	0	vh	lh	h	h
Solub. a/esf. en	0	0	0	lh	lh	lh	ph	ph
pirid. a/esf.	-	-	-	0	0	lh	lh	ph
Insol. a/esf. en	oh	oh	h	h	h	h	h	h
pirid. a/esf.	-	-	-	oh	h	h	h	h
Esfingocelina agregada	-	-	-	10	7.5	5	2.5	1.25

ticas y que hacen falta 2.5 γ de la porción soluble para lograr fijación. Con adición de esfingocelina 1.5 γ basta, pero la diferencia es tan pequeña que no puede hablarse de purificación, por lo menos con este método de medida. La esfingocelina solidifica favorablemente la fijación, pero no con intensidad tal como para que produzca fijación cuando la sustancia ensayada no tiene por sí misma gran actividad, como se comprueba con la porción insoluble en piridina.

Para confirmar estos resultados se realizó un fraccionamiento según P.A. Levene y K. Landsteiner (1927) empleando cantidades de disolventes en la pr porción indicada por esos au-

teres.

Un gramo del antigéno bruto obtenido como se indicó anteriormente, se tomó con 5 cc. de piridina y se hirvió a reflujo. En esta forma la substancia se disolvió completamente, pero por permanencia durante 48 horas a 0°C y subsiguiente centrifugación se separó del conjunto más o menos homogéneo, una masa gelatinosa y un líquido sobrenadante. La piridina, como el agua, da "geles" con estas substancias.

El insoluble separado fue lavado con poca piridina, tomado en otros 10 cc. del mismo disolvente, hervido y la solución dejada a 0°, 48 horas. Como antes, se obtuvo un precipitado que fue de nuevo sometido al tratamiento indicado en el párrafo anterior. Finalmente, el residuo insoluble se cose al vacío (fracción C1 0.67 g.).

La solución piridínica dió por concentración al vacío a baja temperatura, un residuo que trató de disolverse por ebullición a reflujo con 10 cc. de mezcla de cloroformo y alcohol metílico (1:1) quedando una porción insoluble a la que se agregó el precipitado obtenido por estacionamiento a 0°, 24 horas. Este insoluble total es la fracción C2 (0.04 g.).

Con las fracciones C1 y C2 se hizo un ensayo de fijación, cuyos resultados fueron los siguientes:

Cuadro IV

Cantidad en Y	4	3	2.5	2	1.5	1	0.5	0.25
Extr. R17.	0	0	0	0	vh	lh	jh	h
Insol. pirid. C1	jh	jh	jh	jh	jh	ch	h	h
Sol. pirid. ins. clorof.-metil. C2	0	0	0	jh	jh	jh	jh	ch

Los resultados son sensiblemente iguales a los de la experiencia anterior (pág. 24).

Se efectuó también la reacción de la orcina y clorhidrato con acetato de cobre o cloruro férrico, pero no se pudo observar en ningún momento el color púrpura, sino verde, que era menos intenso en la C1.

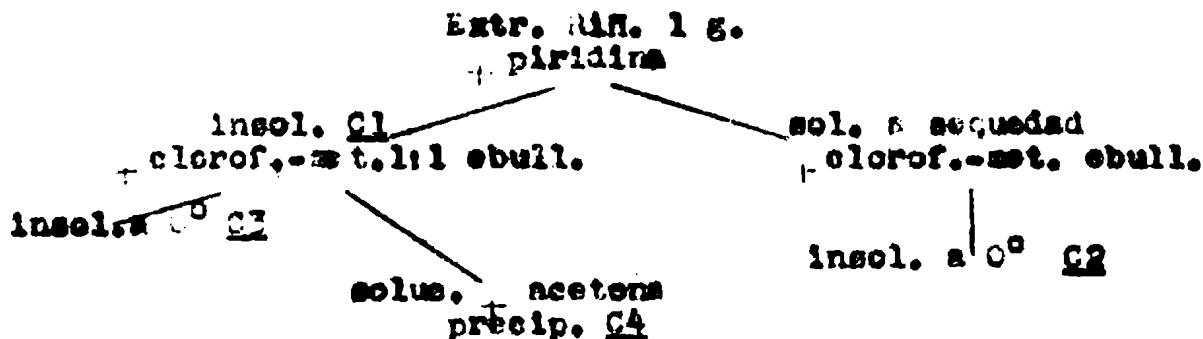
Prosiguióse después intentando fraccionar C1 en esta forma: la ebullición a reflujó de 0.06 g. de esta fracción con 10 cc. de una mezcla 2:1 de cloroformo y alcohol metílico dió una solución casi completa. El reposo a 0°, 24 horas ocasionó poca precipitación de la fracción C3 (0.05 g.). El líquido residual por estacionamiento dió una precipitado que se centrifugó. Por agregado de acetona al líquido resultante precipitó la fracción C4. El poder fijador de estas dos

fracciones va a continuación.

Cuadro V

Cantidad en Y	4	3	2.5	2	1.5	1	0.5	0.25
Extr. R17.	o	o	o	o	vh	lh	jh	h
Insol. clorof.- rat. 2:1 C1	jh	jh	jh	jh	jh	h	h	h
Solub. clorof.- rat. 2:1 C4	o	o	jh	jh	jh	jh	eh	h

Tampoco con la orcina se obtuvo coloración púrpura con estas dos fracciones. La coloración verde fue muy débil para C4. La porción insoluble en piridina no ausenta pues su poder fijador por purificación.



Fracionamiento del Antígeno Bruto según Wals

Como se partía de una sustancia relativamente purificada (antígeno insoluble en alcohol y extraído con éter), el fraccionamiento se comenzó ya con 300 cc. de una mezcla de cloroformo y alcohol metílico 1:3 caliente, en la que se disolvió prácticamente todo el material (40 g.). El residuo (fracción F1) estaba constituido evidentemente por sales y otras impurezas y su poder fijador era casi nulo con relación al original. Es además una fracción muy pequeña. (1.2 g.).

Cuadro VI

Cantidad en	4	3	2.5	2	1.5	1	0.5	0.25
Extr. R17.	0	0	0	0	vh	lh	½h	h
Insol. clorof.- met. 1:2. <u>El</u>	½h	½h	½h	½h	½h	ch	ch	ch

De la solución, por enfriamiento en balancera, precipita

la mayor parte: 24.2 g. (fracción F2). La solución se trata con acetona y precipitan 7.1 g. (fracción F3). El sobrenadante evaporado dió un precipitado de 4.2 g. (fracción F3'). De los 40 g. iniciales se recuperaron 36.7 g.

El poder fijador estaba distribuido por igual entre las fracciones F2 y F3, a pesar de tratarse la F2 de la parte precipitada y la F3 de la presente en solución. Sin embargo tienen más actividad que el original, lo cual es lógico, pues las fracciones F1 y F3' no tienen casi poder fijador.

Cuadro VII

Cantidad en Y	4	3	2.5	2	1.5	1	0.5	0.25
Extr. R18.	0	0	0	0	vh	lh	jh	h
Insol. clorof.- mt. 1:3 F2	0	0	0	0	0	jh	jh	h
Solub. clorof.- mt. 1:3 F3	0	0	0	0	0	lh	jh	jh
Solub. clorof.- mt. 1:3 F3'	h	h	h	h	h	h	h	h
Solub. acetona								

Fraccionamiento de la porción F2; 22 g. de la fracción F2 se llevaron a ebullición con 120 cc. de una mezcla de clo-

reforzo-alcohol metílico en la relación 3:1, es decir, en proporción inversa a la anteriormente empleada. Se disolvió prácticamente todo y después de 24 horas a 0° se centrifugó un abundante precipitado que se produjo. Este precipitado que pesa 16.1 g. constituye la fracción F4.

Del sobrenadante, precipitó con acetona, de acuerdo a la técnica corriente, la fracción F5 que pesa 5.1 g. Por evaporación y nueva precipitación con acetona se obtuvo aún un poco de precipitado (fracción F5') que no se trabajó ulteriormente.

La distribución de actividad entre las fracciones F4 y F5 fue prácticamente la misma, algo mayor en la F5.

Cuadro VIII

Cantidad en	4	3	2.5	2	1.5	1	0.5	0.25
Extr. Riz.	0	0	0	0	vh	lh	½h	h
Insol. clorof.- rat. 3:1 <u>F4</u>	0	0	0	lh	½h	¼h	¼h	¼h
Solub. clorof.- rat. 3:1 <u>F5</u>	0	0	0	0	lh	½h	¼h	¼h

Lo curioso es que haya disminuido con respecto a las fracciones F2 y F3, pero puede muy bien tratarse de un reforzo su-

que en la propia actividad.

La porción insoluble F4 se hirvió nuevamente con 85 cc. de la mezcla cloroformo-álcohol metílico (3:1) anterior. Es más insoluble que antes y no se disolvió en parte. Se dejó todo en reposo a 0° por 24 horas y pasado este tiempo se separó el insoluble. Pesa 11.4 g. y constituye la fracción F6. El sobrenadante se precipitó con acetona, rindiendo 2.4 g. (fracción F7).

La actividad ha disminuido en una y permanecido constante en la otra con respecto a la fracción F4 de la cual se partió, pero se encuentra sensiblemente repartida entre ellas, aunque a la inversa que en el fraccionamiento anterior es algo más intensa en la porción insoluble.

Cuadro IX

Cantidad en Y	4	3	2.5	2	1.5	1	0.5	0.25
Extr. Riz.	0	0	0	0	vh	lh	½h	h
Insol. clorof.- met. 3:1 F4	0	0	0	lh	½h	¼h	¼h	¼h
Insol. clorof.- met 3:1 F6	0	0	0	vh	lh	½h	¼h	¼h
Solub. clorof.- met. 3:1 F7	0	0	vh	vh	lh	½h	¼h	h

De todas maneras, estas diferencias son cosas importantes e interesantes que la circunstancia de que la actividad fijadora disminuye. Esta disminución podría muy bien deberse a una purificación del mismo suero, es un hecho conocido, que el antígeno muy purificado carece de poder fijador, pero que lo adquiere al ser asociado con un lipide de por si inactivo, por ejemplo, la fracción de esfingocelina de leche de vaca.

Cinco gramos de la parte insoluble en cloroformo-etílico se disolvieron a ebullición en 60 cc. de cloroformo-etílico (3:1) y se separó, como de costumbre, en una fracción insoluble (F8) y una porción que quedó en solución y que se precipitó por adición de acetona. (F9).

El estudio del poder fijador de las dos fracciones condujo a un resultado contradictorio con el anterior, pues era mucho más activa la porción soluble que la insoluble, cuyo poder fijador era bastante pequeño. (Cuadro X).

Este resultado puede provenir de una concentración de lipidos que impurifican la fracción F9 que adquiere entonces capacidad fijadora. Como se ve, la purificación que se obtiene por extracción sucesiva de la porción originalmente insoluble en cloroformo-etílico 1:3 (F2) es muy peque-

Cuadro X

Cantidad en	4	3	2.5	2	1.5	1	0.5	0.25
Ext. Rññ.	0	0	0	0	va	1h	2h	h
Insol. clorof.- met. 3:1 F3	2h	2h	2h	2h	2h	2h	en	h
Solub. clorof.- met. 3:1 F2	0	0	0	0	0	0	2h	2h

ña y sobre todo, no hay continuidad en las propiedades de las fracciones obtenidas; en unos casos es más activa la porción soluble y en otros la insoluble.

Se intentó luego repetir el tratamiento sobre la fracción F3, soluble en la mezcla de cloroformo-metílico 1:3. Se obtuvo en primer lugar, una fracción F10' insoluble a temperatura ambiente y de poder fijador prácticamente nulo. Por enfriamiento a 0° de la solución de 2 g. de la fracción F3 y 10 cc. de cloroformo-metílico (3:1) se produce un nuevo precipitado que se centrifuga (fracción F10). Este precipitado es muy soluble y basta el simple calentamiento a temperatura ambiente del líquido que lo envapa, para que se disuelva. Resultó de un gran poder fijador. Menos poder tenía la porción soluble F11, que precipitó por adición de acetona.

Cuadro XI

Cantidad en	4	3	2.5	2	1.5	1	0.5	0.25
Ext. Rfñ.	0	0	0	0	vh	lh	jh	h
Insol. clorof.- met. 3:1 E10'	oh	oh	h	h	h	h	h	h
Insol. clorof.- met. 3:1 E10	0	0	0	0	0	0	jh	h
Solub. clorof.- met. 3:1 E11	0	0	0	0	jh	jh	h	h

Con relación al extracto de ríñón original, la purificación no fue sin embargo muy importante, pasando el poder fijador de 2-1.5 y a 1 y que es el mínimo obtenido en estas experiencias.

Composición Centesimal de las Diferentes Fracciones

Con objeto de ver si podía determinarse alguna relación entre el poder fijador y la variación de algún elemento de los que componen el antígeno, se realizaron determinaciones de C, H, N, P y poder reductor en algunas de las fracciones preparadas. El cuadro XII detalla los resultados obtenidos.

La comparación de las fracciones fijadoras con igual intensidad indica de inmediato que no pueden sacarse conclusiones de ninguna clase, por cuanto no hay relación ninguna entre su composición y poder fijador así como tampoco existe relación entre la actividad fijadora y el poder reductor. Así las fracciones F9 y F10 que son fijadoras de igual intensidad, tienen C, H y poder reductor diferentes. Más acentuadas son aún las diferencias porcentuales entre F2 y F3. En el conjunto, lo único que se mantiene dentro de cifras cercanas es el valor del nitrógeno, de alrededor de 3.

Si se comparan estos valores con los de un cerebrósido, llama la atención que el valor del nitrógeno es mucho mayor que para estas sustancias. Los valores obtenidos por nosotros para el nitrógeno y el fósforo se acercan a los cita-

Cuadro XIII

	Poder fijador (1)	C %	H %	N %	P %	Conizas %	Poder reductor (2)
F9	1	64.09	11.85	3.34	1.85	6.85	11.6
F10	1	70.52	16.86	3.78	---	8.12	8.3
F2	1.5	55.60	10.91	3.13	1.51	---	14.1
F3	1.5	66.80	12.51	5.17	2.75	11.54	5.9
F5	2	67.65	12.49	2.99	2.52	10.12	9.2
F11	2				3.07		2.3
F4	2.5	63.08	10.75	2.57	---	7.47	13.8
F6	2.5	63.56	10.53	3.08	---	7.00	13.5
F7	3	67.25	12.33	3.23	---	12.00	8.0
F8	no fija	61.66	10.72	3.03	---	7.69	22.9
Frenosina	---	69.59	11.33	1.69	---	---	---
Estearil-oleil- lecitina.	---	65.53	10.98	1.73	3.84	---	---
Esfingomeli- na de rición.	---	64.8	11.4	3.52	3.82	---	---
Fracción Le- vene y Land- steiner. (3)	---	59.64	10.09	2.33	1.19	4.22	---
Fracc. XV de Brauns. (4)	0.075 (5)	55.92	8.93	2.75	1.58	11.55	---
		61.01	10.23	2.02	0.10	4.63	30 (6)

(1) cantidad en que fija dos dosis hemolíticas. (2) des-
pués de hidrólisis y calculado en galactosa por ciento. (3) Leve-
ne y Landsteiner, J. of Biol. Chem., 25, 607, 1927. (contienen azufre).
(4) Chemical Studies on the True Forssman Hepten, etc. Stockholm (1930).
(5) cantidad en que fija una dosis hemolítica. (6) calculado
en glucosa por ciento.

dos por E. Landsteiner y P. A. Levene, no así a los que da Brunius para las fracciones purificadas según su método, donde el fósforo decrece notablemente haciéndose menor del 1 % y manteniéndose el nitrógeno en un valor poco mayor del 2 %. La reacción de la creina no ha dado en ningún momento los resultados esperados de acuerdo a lo indicado por Levene y Landsteiner para un material aislado de los lípidos del riñón de caballo y por Wals para uno de base de vacuno. Calentando la sustancia en baño maría, con creina, ácido clorhídrico y una gota de solución de acetato de cobre o de cloruro férrico en otras oportunidades, no hemos obtenido color rojo o rojo púrpura como dicen los autores citados. En cambio apareció color verde de intensidad variable con respecto a un tipo de lactosa que se trataba simultáneamente y en cantidad igual a la de las fracciones ensayadas. En el cuadro siguiente se consignan los valores aproximados que alcanzaron las intensidades del color verde comparado con el color del testigo de lactosa. Con algunas fracciones como F10 y F11 no se modificó el color del reactivo.

Los resultados de la reacción de Molisch, que también se realizó con cantidades iguales de cada fracción y de lactosa como testigo, van así mismo, a continuación.

Cuadro XIII

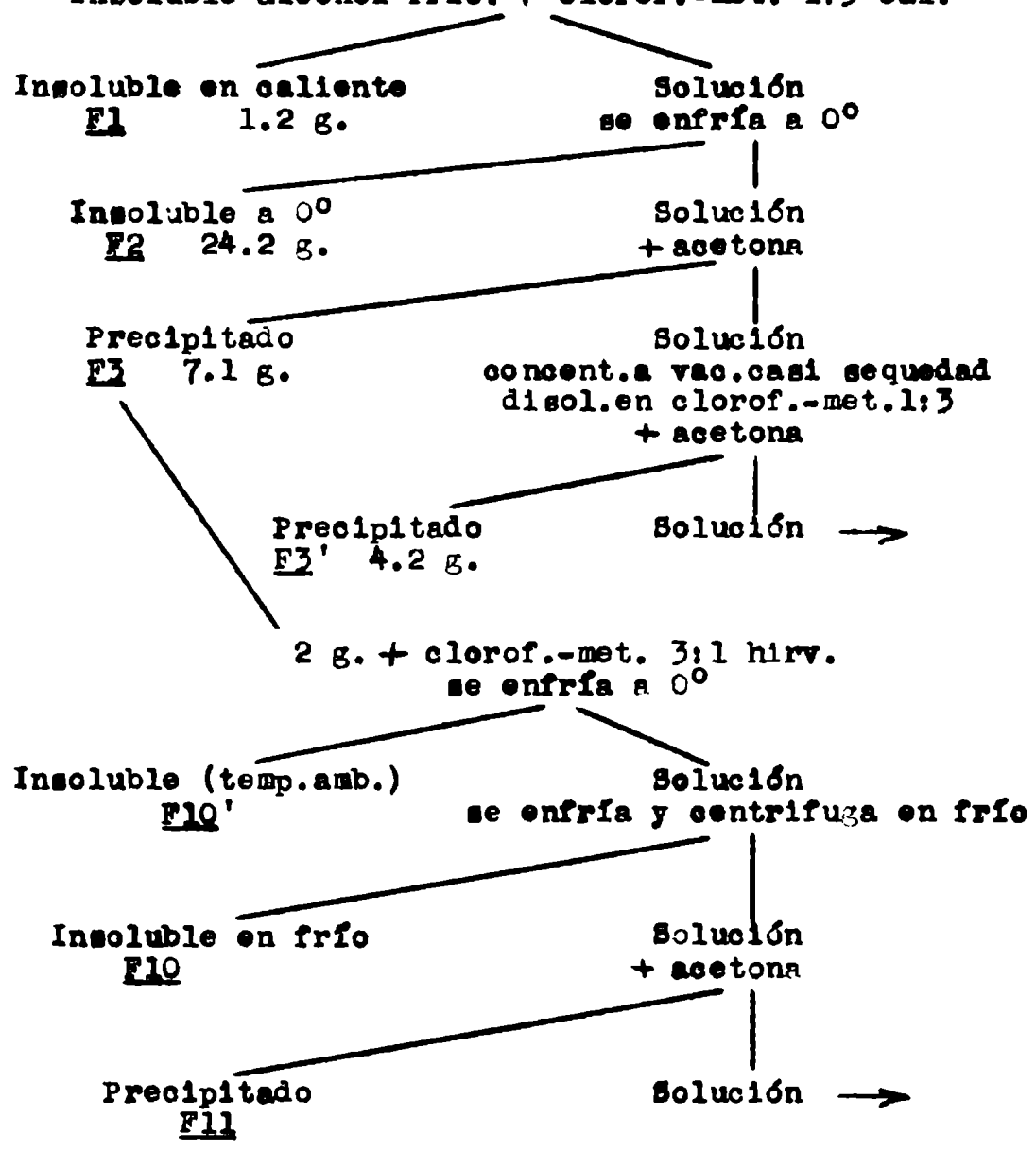
Poder fijador decreciente	Orcina	Helich
F9	½L ^(*)	¾L
F10	--	¾L
F2	¾L	¾L
F3	½L	¾L
F5	¾L	¾L
F11	--	¾L
F4	L	¾L
F6	L	L
F7	¾L	¾L

(*) L significa aproximadamente la intensidad de la reacción para una cantidad igual de lactosa.

Agradecemos al Dr. Rafael Labriola el haber realizado las determinaciones de carbono, hidrógeno y nitrógeno de las fracciones que figuran en el Cuadro XIII.

**Fracionamiento según Wals
(con ligeras modificaciones)**

**Extracto Riñón 40 g. Soluble alcohol caliente.
Insoluble alcohol frío. + clorof.-met. 1:3 cal.**



24.2 g. fracción F2 + clorof.-met. 3:1 hirv.
se enfría a 0°

Insoluble
F4 16.1 g.

Solución
+ acetona

Precipitado
F5 5.1 g.

Solución
concent.a vac. ca si se quedad
disolv.en poco alcohol caliente
+ acetona

Precipitado
F5'

Solución →

+ clorof.-met. 3:1 caliente
se enfría a 0°

Insoluble
F6 11.4 g.

Solución
+ acetona

Precipitado
F7 2.4 g.

Solución →

5 g. + clorof.-met. 3:1 hirviendo

Insoluble
F8

Solución
+ acetona

Precipitado
F9

Solución →

Resumen y Conclusiones

1o.) Se ha efectuado el fraccionamiento por medio de disolventes, del antígeno heterogénico (hapteno) de riñón de caballo.

2o.) Por medio de piridina y luego mezcla de cloroformo-metílico se ha llegado a un producto del cual 3 γ fijaban dos dosis hemolíticas del anticuerpo heterogénico.

3o.) Por el empleo de mezclas de cloroformo y alcohol metílico se han obtenido fracciones de las cuales 1 γ fija dos dosis hemolíticas.

4o.) Durante los procesos de purificación, se obtienen a menudo fracciones, todas las cuales son de menor poder fijador que la original y por lo tanto, con pérdida cuantitativa de la actividad fijadora, hecho que atribuimos a que durante las mencionadas operaciones se eliminan lípidos que activan la fijación, puesto que la adición de esfingomielinacerebrósidos las hace más activas.

5o.) La presencia, en las fracciones estudiadas, de lípidos activantes y de la sustancia realmente activa (hap-

tene) dificulta por lo tanto el estudio cuantitativo de esta última fracción y es de recomendar iniciar la purificación con una substancia cuyo poder fijador, por sí, sea nulo, tal cual se obtiene sometiendo los extractos a una hidrólisis alcalina. (Brunius).

BIBLIOGRAFIA

- Brunius (1936) - Chemical Studies on the True Forssman Hap-
ten, the Corresponding Antibody and Their
Interaction. Tesis. Stockholm.**
- Bushbinder (1935) - Arch.Patholog., tomo 19, pág.856.**
- Combienco, Soru, Stamatesco, Nestoresco y Aubert (1930) -
Comp.Rend.Soc.Biol., tomo 109, pág.791.**
- Doerr y Hallauer (1925) - Z.Immunit.Forsch., tomo 45, pág.170.**
- Doerr y Pick (1913) - Biochem.Z., tomo 50, pág.129.**
- Forssman (1911) - Biochem.Z., tomo 37, pág.78.**
- Friedberger y Suto (1919) - Z.Immunit.For., tomo 28, pág.217.**
- Georgi (1919) - Arb.Inst,Exp.Therap., cuaderno 9, pág.43. (cit.
por Landsteiner y Simms (1923)).**
- Gonzalez y Armangué (1931) - Comp.Rend.Soc.Biol., tomo 106,
pág.1006.**
- Gonzalez, Armangué y Morato (1932) - Id., tomo 110, pág.216.**
- Jacobs (1934) - J.Exp.Med., tomo 59, pág.479.**
- Landsteiner y Jacobs (1932) - Proc.Soc.Exp.Biol.Med., tomo 29,
pág.570.**
- Landsteiner y Jacobs (1933) - Id., tomo 30, pág.1055.**
- Landsteiner y Lampl (1918) - Biochem.Z., tomo 86, pág.343.**
- Landsteiner y Levene (1925) - J.of Immunol., tomo 10, pág.731.**

- Landsteiner y Levene (1926) - J.of Immunol.,tomo 14,pág.81.
- Landsteiner y Simms (1923) - J.Exp.Med.,tomo 38,pág.127.
- Levene y Landsteiner (1927) - J.Biol.Chem.,tomo 75,pág.607.
- Meyer (1921) - Biochem.Z.,tomo 122,pág.225; id.,tomo 129,
pág.294.
- Sordelli y Fischer (1918) - Rev.Inst.Bact.tomo 1,pág.229.
- Sordelli, Fischer, Wernicke y Pico (1921) - Comp.Rend.Soc.
Biol.,tomo 84,pág.1921.
- Sordelli, Wernicke y Deulofeu (1924) - Rev.Inst.Bact.,tomo 4,
pág.15; Comp.Rend.Soc.Biol.,tomo 92,pág.898.
(1925).
- Taniguchi (1921) - J.Path.and Bact.,tomo 24,pág.217.
- Walz (1927) - Zeit.Phy.Chem.,tomo 166-67,pág. 210 .
- Wernicke y Sordelli (1919) - Rev.Inst.Bact.,tomo 2,pág.281.

W. D. Jones



W. D. JONES