

Tesis de Posgrado

Acción del isocianato de fenilo sobre toxina diftérica

Rosenblatt, Rosa

1948

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química 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:

Rosenblatt, Rosa. (1948). Acción del isocianato de fenilo sobre toxina diftérica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0575_Rosenblatt.pdf

Cita tipo Chicago:

Rosenblatt, Rosa. "Acción del isocianato de fenilo sobre toxina diftérica". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1948.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0575_Rosenblatt.pdf

ACCION DEL ISOCIANATO DE FENILO SOBRE

TOXINA DIFTERICA

TESIS

Presentada para optar al título de Doctora en química

por

ROSA ROSENBLATT

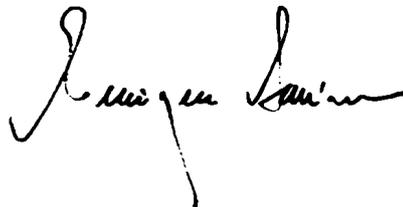
Tesis - 575

Año 1948

Este trabajo ha sido realizado en la Sección del INSTITUTO BACTERIOLOGICO MALBRAN, a cargo del Doctor I. Pirotsky a quien agradecemos la sugestión del tema y la eficaz ayuda prestada en todo momento.

Expresamos también a la Doctora Rosa de Pirotsky nuestro reconocimiento por su valiosa colaboración técnica.

Dejamos especial constancia de las facilidades otorgadas por la Dirección del Instituto para la realización de esta tesis.

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Enrique Larrea". The signature is written in black ink on a white background.

INTRODUCCIÓN.

El análisis de las modificaciones que se imprimen a las proteínas con actividad biológica propia cuando se las trata con reactivos de reconocida afinidad por determinadas estructuras químicas, ha permitido poner en evidencia una correlación entre dicha actividad y ciertos grupos funcionales libres de la molécula de estas proteínas.

Los resultados experimentales concuerdan en señalar a los hidroxilos y amino grupos libres como funciones químicas de particular significación en este sentido.

Esta conclusión ha surgido de la aplicación y estudio de los efectos de reactivos como el isocianato de fenilo, el cetene y el formol sobre diferentes proteínas, del tipo suero-proteínas, hormonas y virus.

Las alteraciones de la especificidad de los antígenos suero-proteínas provocadas por acción del formol o del isocianato de fenilo, aportan suficientes elementos de juicio para sostener que si bien existen evidencias de que los grupos aromáticos están en relación en alguna forma con la especificidad, los grupos no aromáticos intervienen indudablemente en la determinación de la especificidad de especie.

En este sentido es interesante recordar las diferentes consecuencias inmunológicas del formol y del isocianato de fenilo.

El formol convierte a las suero-proteínas en sustancias que producen en el conejo anticuerpos solo para el compuesto antígeno-formol empleado y no para compuestos formol-proteínas de otras especies.

En cambio, el isocianato de fenilo si bien no produce pérdidas del poder antigénico de la suero-proteína, provoca una marcada alteración de la especificidad. Así anticuerpos obtenidos con una proteína modificada (fenil-ureído suero-globulina de caballo) reaccionan muy bien con su correspondiente antígeno y con proteínas de otras especies que hayan sufrido la misma modificación (fenil-ureído suero-proteína de pollo, fenil-ureído caseína, fenil-ureído gelatina, etc.).

Esta diferente acción del formol y del isocianato de fenilo sobre las proteínas, tiene por base la intervención de grupos reaccionales distintos.

La naturaleza de la reacción entre formaldehído y aminoácidos simples es poco conocida y poco se sabe por tanto del mecanismo de la reacción formol-proteínas. Se acepta que el formol actúa fundamentalmente sobre alfa amino grupos. En cambio se ha podido ahondar con más exactitud los grupos reaccionales involucrados por el isocianato de fenilo. Este reactivo interfiere principalmente con los amino grupos libres de la lisina y presumiblemente con sus eta amino grupos.

En base a estos antecedentes inmunoquímicos que más adelante serán expuestos 'in extenso', nos ha parecido interesante estudiar el efecto del isocianato de fenilo sobre toxina diftérica y sobre la misma toxina tratada previamente por formol.

La toxina diftérica es una proteína caracterizada por tener signos experimentales definidos.

El proceso de transformación de la toxina diftérica en anatoxina por acción del formol es bien conocido. En condiciones adecuadas pierde su toxicidad conservando inalteradas sus propiedades antigénicas y demás signos experimentales.

En cambio poco se sabe del efecto del isocianato de fenilo sobre toxina diftérica.

Por lo cual en el presente trabajo nos hemos propuesto desarrollar los puntos siguientes:

- 1º.- Examen cuantitativo de la acción del isocianato de fenilo sobre dosis mínima mortal, Lf, Kf, y Lt, de la toxina diftérica.
- 2º.- Examen cuantitativo de la acción de dicho reactivo sobre Lf, Kf y poder de combinación 'in vivo' de la anatoxina derivada de la misma toxina.
- 3º.- Verificación de las características antigénicas de los productos que resultan de la acción del isocianato de fenilo sobre toxina y anatoxina diftérica.

CAPITULO IISOCIANATO DE FENILO

De las dos posibles series de ésteres del ácido ciánico, los cianatos $R-O-C\equiv N$ y los isocianatos $O=C=N-R$, solo los últimos son conocidos, mientras que con el correspondiente ácido tiociánico pueden obtenerse ambas series de ésteres.

Los ésteres isociánicos son bien conocidos. Fueron preparados por primera vez por A. Wurtz en 1854 por destilación de las sales alquílicas del ácido sulfúrico con isocianato de potasio; lo condujeron al descubrimiento de las aminas primarias simples.



El rendimiento del isocianato obtenido por este método es pequeño porque una fracción del producto polimeriza.

Un método más conveniente para preparar los ésteres alifáticos es calentar el cianato de potasio con el apropiado sulfato dialquilo en presencia de carbonato de sodio seco; si el sulfato dialquilo no es factible, puede usarse el éster sulfónico p-tolueno, formado por la acción del cloruro sulfónico sobre el alcohol en presencia de piridina.

Los ésteres isociánicos pueden ser formados también por la acción del cloruro de carbonilo sobre aminas; el cloruro de carbamilo es un producto intermedio que pierde ácido clorhídrico:



El isocianato de fenilo es preparado comunmente de esta manera: Se hace pasar el fosgeno sobre clorhidrato de anilina a 800° , o calentado con el HCl en benceno bajo presión a 120° .

Otro método general de preparación es obtener el N sustituido, uretano de una amina y el éster cloroformico y destilarlo con P_2O_5 :



Otras reacciones en las cuales se forman, son aquéllas entre el cianato de plata y un ioduro de alquilo; la oxidación de los isocianuros con óxido mercúrico; la reacción de Hofmann para la conversión de una amida en una amina y la descomposición de acil-azidas que llegan con pérdida de N a isocianato cuando son calentadas en un solvente indiferente.

La estructura de estos ésteres es reconocida como $R-N=C=O$ por sus métodos de formación y por su hidrólisis por ácidos minerales y álcalis, en una amina y CO_2 .

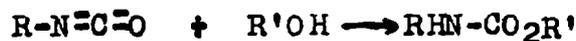
Son líquidos volátiles, de un aroma poderoso y desagradable, los que cuando son puros pueden ser guardados por meses, sin cambio.

Pequeñas cantidades de impurezas, por ejemplo, sales como el acetato de sodio, a menudo, los polimerizan en trimeros, los llamados ésteres del ácido isocianúrico.

Aparte de su hidrólisis, la reacción más importante de los ésteres comprende la adición al grupo $C=N$.

Con compuestos hidroxilados, tales como alcoholes de todos los tipos y fenoles, resulta un éster del ácido carbámico (un uretano)

y con aminas primarias y secundarias, una urea sustituida:

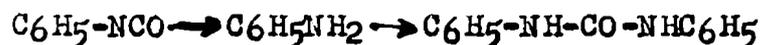


Estas adiciones tienen lugar con gran facilidad y por consiguiente el isocianato de fenilo ha sido a menudo usado para ambos como un reactivo de revelación de los grupos hidroxilos y aminos; y también para la identificación de alcoholes, desde que los N-fenil uretanes son derivados sólidos fácilmente aislables y purificables.

El naftil-isocianato es usado a menudo de preferencia al éster fenilo, porque los uretanes y ureas derivados de él, son menos solubles y por eso pueden realizarse con pequeñas cantidades.

En presencia de agua, los ésteres isocianáticos dan ureas sustituidas simétricamente, desde que una parte del éster es hidrolizado a amina, la que se combina con el éster sin cambio.

Así el fenil-isocianato da difenilurea; por consiguiente el agua debe ser excluida cuando el isocianato es usado como reactivo:



Los ésteres también reaccionan con ácidos; los productos principales son CO₂ y la amida sustituida del ácido:



CAPITULO II

ISOCIANATO Y PROTEINAS

1.- Antecedentes.

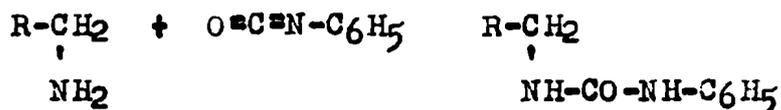
RAPER(1) preparó derivados del fenilisocianato de varias fracciones de peptonas y de la suero-albúmina, obteniendo compuestos con punto de fusión definidos.

FOLLEY(2) obtuvo el fenilisocianato de plasteína.

Pero débese a HOPKINS y WORMALL(3) el primer estudio sobre compuestos de proteínas con isocianato de fenilo y sus propiedades inmunológicas. Estos autores prepararon derivados del isocianato de fenilo de caseinógeno, de gelatina, suero-globulina y comprobaron el alto valor antigénico de los mismos.

2.- Naturaleza de la reacción entre isocianato y proteínas.

Según HOPKINS y WORMALL(3), la combinación entre isocianato de fenilo y proteínas, estaría relacionada sobre todo con los grupos amino libres de la molécula proteica, para dar una reacción del tipo siguiente:



Esto debe dar como resultado una disminución de los amino grupos libres y presumiendo que no hubiera otros cambios, esta dismi-

nución resultaría ser la medida de la extensión de la reacción. y del número de los nuevos grupos introducidos. En efecto, en algunos casos, como cuando se hace actuar isocianato de fenilo o p-bromo isocianato de fenilo sobre caseinógeno, desaparece hasta el 80 a 90% del amino nitrógeno libre. Esta disminución del amino nitrógeno libre, parece mostrar que ocurre una reacción entre el isocianato de fenilo y los amino grupos libres de la molécula proteica.

En general, este método de introducir nuevos grupos reactivos es ventajoso. Es rápido y no es drástico, pues se realiza a bajas temperaturas y en soluciones neutras o prácticamente neutras. El exceso de reactivo reacciona con agua para dar un compuesto insoluble, difenilurea, que se elimina fácilmente.

3.- Relación entre el número de amino grupos que desaparecen y el número de nuevos grupos introducidos en la molécula proteica.-

La prueba de que ocurre un solo tipo de reacción involucrando la formación de grupos fenilureidos, sería más completa si se pudiera mostrar que el número de nuevos grupos que entran en la molécula proteica es igual al número de amino grupos que desaparecen. Esto se ha podido comprobar con el p-bromo isocianato de fenilo sobre proteína, determinando la cantidad de bromo en el nuevo producto formado y conociendo el valor del amino nitrógeno de la proteína.

Para el caso del caseinógeno, se calculó que el compuesto p-bromo fenilureído debía contener 3,9% de Br. y el valor observa-

do fué de 4,1%.

En las preparaciones con gelatina, las muestras de p-bromo fenilureído gelatina que debían contener 1,8 y 2,4% de Br. respectivamente, dieron 2,2 y 2,6%. Estos resultados pueden considerarse como altamente satisfactorios y parecerían demostrar que la reacción se realiza entre p-bromo fenil isocianato y los grupos amino libres.

4.- Estudios inmunológicos.

La administración al conejo por vía parenteral del compuesto fenilureído suero-globulina de caballo, da lugar a la formación de un suero que reacciona fuertemente 'in vitro', en un sistema de precipitinas, con el antígeno utilizado en la inmunización, esto es, con el compuesto fenilureído suero-globulina de caballo.

Además, se verifican los hechos siguientes:

a) Suero de conejo anti-fenilureído suero-globulina de caballo, da reacción moderada débil o negativa frente a suero de caballo o suero-globulina de caballo no tratadas.

b) Suero de conejo anti-fenilureído suero-globulina de caballo, reacciona bien frente a compuestos fenilureídos suero de pollo, o de conejo, pero no reacciona con suero de pollo o de conejo sin tratar.

c) En cambio, suero de conejo anti-suero-globulina de caballo sin tratar reacciona bien con el compuesto fenilureído suero-globulina de caballo.

Los hechos señalados en los párrafos precedentes, permi-

tirían deducir que el compuesto fenilureído proteína, es un excelente antígeno, que pierde en cierta proporción por lo menos, las características especie específicas y que la suero-globulina contenida en un compuesto fenilureído suero-globulina conserva inalteradas sus características antigénicas originales.

Esta retención de parte de la especificidad original parece indicar la presencia en la molécula proteica alterada, de alguno o todos esos grupos o estructuras que normalmente determinan la especificidad de especie, y esto puede ser debido: a) al hecho que estos grupos no interfieren en modo alguno sobre el isocianato de fenilo, o b) a una reacción incompleta entre la proteína y el isocianato de fenilo.

La 2ª posibilidad tiene ciertamente más verosimilitud, por la experimentación, desde que la determinación del amino N, muestra que con las proteínas usadas para la inmunización (suero-globulina de caballo y su derivado fenilureído), el compuesto último aún retiene 1/3 parte de su amino N libre, de lo que se deduce que solo 2/3 de los grupos reactivos de la molécula proteica se han combinado con el isocianato de fenilo.

Una explicación alternativa, sin embargo, podría darse, aceptando que la introducción de cualquier nuevo grupo en una molécula proteica produce un nuevo arreglo estructural que predominaría sobre los otros grupos de la molécula en determinar la formación de anticuerpos.

Así, la inyección de fenilureído suero-globulina de caballo podría, de acuerdo con este punto de vista (HOPKINS y WORMALL(3)),

producir anticuerpos que estén principalmente dirigidos contra los grupos fenilureídos y podría no dar ocasión a una respuesta significativa del anticuerpo que responde a los grupos determinantes de la especificidad de la suero-globalina de caballo, aunque estos últimos grupos pueden estar inalterados por el tratamiento con isocianato de fenilo.

Cualquier explicación que se adopte, es posible destacar de lo expuesto que: los grupos atacados por el isocianato de fenilo estarían relacionados en parte por lo menos con la especificidad de especie original y que el isocianato de fenilo reacciona con los amino grupos libres de la molécula proteica.

Las pruebas químicas citadas aunque sugestivas no son concluyentes, pero las pruebas serológicas de inhibición, suministran nuevos argumentos al punto de vista de que el isocianato de fenilo reacciona con los amino grupos libres de la molécula de lisina.

5.- Pruebas inmuoquímicas sobre la intervención de los amino grupos libres en la reacción proteína-isocianato.

A fin de probar que la reacción entre isocianato de fenilo y proteínas involucra los amino grupos libres de la molécula proteica y para definir más precisamente la naturaleza de los grupos responsables de la nueva especificidad inmunológica, HOPKINS y WORMALL(3) hicieron ensayos con compuestos fenilureídos de glicina, alanina y lisina y determinaron la influencia en las pruebas de inhibición de estos compuestos y de los mismos aminoácidos sin tratar.

Los resultados experimentales muestran que todos estos com-

puestos de fenilureídos aminoácidos inhiben en una marcada proporción y en el caso de la lisina compuesto, totalmente, la reacción entre las fenilureído proteínas y los correspondientes anticuerpos, mientras no perturban la formación de precipitados en reacciones de antígenos-anticuerpos del tipo suero-proteína de caballo y su anticuerpo correspondiente.

En estos experimentos los compuestos fenilureídos aminoácidos y los aminoácidos sin tratar fueron usados en cantidades equimoleculares, pero el hecho de ejercer el compuesto de lisina una mayor influencia y la circunstancia de contener dos grupos fenil-ureídos, hizo que se realizaran pruebas similares con la mitad de la concentración molecular de este compuesto, verificándose que en estas condiciones se obtiene invariablemente completa inhibición de la reacción de precipitación del compuesto fenilureído proteína.

Con todo, cuando el isocianato de fenilo reacciona sobre la molécula proteica, intervendría uno solo de los amino grupos de la lisina, presumiblemente el ϵ -amino grupo.

Un argumento más en favor de que el isocianato de fenilo reacciona con el amino grupo de la lisina está dado por la dificultad de preparar p-bromo fenil isocianato de zeína, por ser una proteína que carece de lisina.

CAPITULO III

ANTECEDENTES SOBRE INACTIVACIÓN DE CIERTAS PROTEINAS POR ISOCIANATO DE FENILO O CETENE.

Consideramos de interés resumir los trabajos relativos a la acción del isocianato de fenilo y del cetene sobre diferentes proteínas biológicamente activas, antes de referirnos a nuestros resultados experimentales.

HOPKINS y WORMALL(4) comprueban que la insulina es completamente inactivada por tratamiento con isocianato de fenilo. Este reactivo bloquea los amino grupos libres y no reacciona en forma apreciable con el OH de la tirosina, en las condiciones en que han trabajado los autores. Obtienen preparados de p-bromo fenilureído insulina que contienen 4,8 a 5,5 y 5% de Br. El valor teórico que encuentran para la reacción completa con todos los amino grupos libres es de 5%. Llegan a la conclusión de que en la insulina los grupos básicos son necesarios para la actividad biológica.

Posteriormente GAUNT y WORMALL(5) estudian los amino grupos libres de la molécula insulina que son atacados por isocianato de fenilo, para lo cual consideran necesario encontrar los aminoácidos de esta proteína que tienen amino grupos libres. Encuentran que los grupos reactivos de una proteína son posiblemente los siguientes: grupo hidroxilo de la tirosina, el sulfuro de cistina, el grupo sulfhidrilo de la cisteína, imidazol de la histidina, guanidina de la arginina, piperolidina de la prolina y el grupo aminoácido de asparagina y gluta-

Según los autores, el isocianato de fenilo no reacciona con ninguno de los grupos citados, salvo el grupo sulfhidrilo de la cisteína que no tienen en cuenta porque la insulina no contiene SH. La reacción con el grupo pirrolidina de la prolina y en alguna extensión con el grupo guanidina de arginina no dan cuenta de la inactivación de la hormona.

STERN y WHITE(6) estudian la reacción entre cetene e insulina. Comprueban que cuando el tiempo de acetilación es corto, cinco minutos, solo los amino grupos libres son acetilados. Si la reacción continúa treinta horas, el grupo hidroxilo de la tirosina es lentamente acetilado.

La acetilación de amino grupos no afecta apreciablemente la acción farmacodinámica de la insulina. Cuando los hidroxilos de la tirosina son acetilados, la actividad decrece y este efecto es proporcional al número de estos grupos bloqueados.

HERRIOTT y NORTHROP(7) encuentran también que para la pepsina es posible acetilar prácticamente todos los amino grupos libres mediante el cetene, sin pérdida de la actividad enzimática. El bloqueo de los grupos hidroxilos fenólicos causa inactivación.

LI, SIMPSON y EVANS(8) estudiando la acción del cetene sobre hormonas gonadotrópicas concluyen que la actividad fisiológica de las hormonas estimulantes de células intersticiales y de folículos de pituitaria, así como la hormona gonadotrópica de suero de yeguas preñadas, depende en cada caso de los amino grupos libres. En cambio, el principio gonadotrópico de orina (gonadotropina coriónica) semeja a la insulina y pepsina, en que los hidroxi-grupos fenólicos más que los

amino grupos son esenciales para su actividad fisiológica.

MILLER y STANLEY(9) han preparado derivados acetilo y fenilureidos del virus mosaico del tabaco y comprueban que alrededor del 70% de los amino grupos pueden ser cubiertos ya sea con grupos acetil o fenilureidos sin inactivación apreciable del virus. Subsiguiente bloqueo determina pérdida de la actividad. En cambio, solo del 20 al 40% de los grupos fenol más indol pueden ser cubiertos, sin inactivación; concluyen que el 70% de los amino grupos y 20 a 40% del grupo fenol en la molécula del virus mosaico del tabaco no son importantes para las reacciones fundamentales en la reproducción del virus, pues cuando muestras del producto derivado son inoculadas en plantas de tabaco, se comprueba el desarrollo de un virus normal.

BISCHOFF(10) estudiando la reacción entre gonadotropina coriónica e isocianato de fenilo, establece que a semejanza de la gonadotropina suérica, aquélla hormona es inactivada en más del 90% por acción del isocianato, siempre que la reacción se realice en las condiciones experimentales consideradas como específicas para la reacción de amino grupos. Estos resultados contradicen los de LI y colaboradores, obtenidos con cetene.

En resumen, de lo expuesto se deduce que el isocianato de fenilo reacciona solo con amino grupos de las proteínas cuando esta reacción se ajusta a las condiciones establecidas por HOPKINS y WORMALL, GAUNT y WORMALL. Sin embargo MILLER y STANLEY han comprobado que el isocianato de fenilo puede cubrir los grupos hidroxilos de la tirosina, en el caso del virus mosaico del tabaco. Igual proceso ocurre con el cetene.

En reacciones de corta duración, el proceso queda limitado a los amino grupos; cuando la reacción de acetilación se prolonga, se bloquean los amino grupos y los hidroxilos de la tirosina. Además el cetene no sería un reactivo específico de amino grupos de proteínas; reacciona no solamente con tirosina sino también con un tercer componente (WOOD y ROSS) (11).

Por otra parte, ello explicaría porque, los resultados obtenidos con isocianato no siempre concuerdan con los obtenidos con cetene, respecto al significado fisiológico de los hidroxilo y amino grupos de estas proteínas.

CAPITULO IV

DEFINICION DE TOXINA DIFTERICA

Según PAPPENHEIMER(12), el producto final de la purificación de la toxina diftérica, es una sustancia amarilla pálida en solución al 2% y casi blanca al secarse por el método de FLOSDORFF y MUDD. Las siguientes pruebas para proteínas en soluciones diluidas, como biuret, ninhidrina, xantoproteica y Millon son positivas. Las pruebas de Hopkins y Cole y de Ehrlich, p-dimetilaminebenzaldehida para triptofano son fuertemente positivas en solución al 1%.

La prueba de Sakaguchi para arginina es también fuertemente positiva y la diazorreacción de Ehrlich da un pronunciado color naranja.

El material da solo una muy débil reacción de Molish en solución al 1% y no contiene P. La prueba de nitroprusiato para sulfhidrilo es negativa. La proteína es coagulada completamente por calentamiento en medio ácido. Del 92 al 100% del N es precipitado de una solución al 1,5% con ácido tricloroacético. La toxina es precipitada completamente de una solución al 1,5% con sulfato de amonio entre 0,5 y 0,6 de saturación.

En el siguiente cuadro da los valores de la composición química de la toxina diftérica purificada.

COMPOSICION QUIMICA DE LA TOXINA DIFTERICA PURIFICADA

<u>COMPONENTES</u>	<u>%</u>
C	51,47
H	6,75
N	16,1
S	0,70
P	0,05
amino N(Van Slyke)	1,12
amino N(titulación acetona)	1,14
tirosina	8,0
triptofano	1,36
cenizas	1,36
$[\alpha]_D$	-36°
punto isoelectrico	4,1 ± 0,1

Aunque los datos encontrados no deben ser tomados en ningún sentido como un criterio absoluto y terminante de pureza, estos números sirven para caracterizar y diferenciar a la toxina diftérica como una proteína, a pesar de que hasta el presente no se ha encontrado ninguna evidencia química para explicar su pronunciada toxicidad.

Según PAPPENHEIMER el dato más convincente para la pureza de ~~estas~~ preparaciones, es la relación entre el valor de N por Lf para la toxina diftérica, obtenida de un estudio cuantitativo de la reacción de floculación y el valor encontrado por aislamiento.

El estudio cuantitativo de la reacción de floculación, en

indica 0.00046 mg de N por unidad de Lf de toxina diftérica. Este número es igual al encontrado en las preparaciones purificadas, dentro de los límites del error experimental, y también al valor encontrado por EATON(13) para la toxina aislada de un medio de peptona.

El material de EATON contenía 0.0005-0.0006 mg N/Lf, del cual 0.00045 a 0.0005 mg era precipitado por ácido tricloroacético.

El material de PAPPENHEIMER difiere del de EATON en dos aspectos. EATON dice que en las pruebas cualitativas, su toxina no contiene S ni triptofano, en cambio la de PAPPENHEIMER da 0,75% de S por análisis. No hay duda de que este S es orgánico. Según este mismo autor(19), 1 g. de toxina purificada contiene los siguientes aminoácidos básicos: 2,2% de histidina, 3,7 de arginina y 5,3 de lisina.

Sobre la base de su contenido en triptofano, la toxina diftérica tiene un peso molecular mínimo entre 14.000 y 18.000. Otros autores indican como peso molecular el de 72.000, dato obtenido por los métodos comunes de medición y por lo tanto inseguro.

De acuerdo con ciertas constantes físicas, se puede agrupar a la toxina diftérica dentro del grupo de las proteínas globulares, como a la mayoría de las proteínas del suero; se entiende por proteína globular la que no muestra mucha asimetría y presenta agrupación esférica de los diferentes aminoácidos, en contraste con la proteína fibrosa que es muy asimétrica con sus aminoácidos ordenados en forma lineal.

Como todas las proteínas, está constituida por una cadena

de polipéptidos, equipados con cadenas laterales, las que se encuentran libres de ligaduras covalentes, propiedad que determina la hidrofilia.

La alta sensibilidad hacia la mayor parte de las sustancias químicas y el cambio de las condiciones físicas (movimiento, temperatura, irradiación) da como resultado un cambio en la configuración nativa, altamente específica de la proteína, hacia una estructura más desordenada, comparable al cambio de una estructura cristalina al estado amorfo. Este proceso, llamado desnaturalización, está acompañado en general con disminución de la solubilidad, aumento de la viscosidad, liberación de grupos de oxidación-reducción y amplia pérdida de la actividad biológica.

Esta actividad biológica, que define desde este punto de vista a la toxina diftérica, se halla expresada por un conjunto de signos experimentales. Estos se refieren ya sea a la toxicidad misma o a los efectos que resultan 'in vivo' o 'in vitro' de la combinación de la toxina diftérica con su respectiva antitoxina.

A continuación nos limitamos a la definición de ellos:

1) Dosis mínima mortal.-(d.m.m.). Es la menor cantidad de toxina que inyectada subcutáneamente, a cobayos de 250g. de peso, los puede matar alrededor del 5º día.

2) Dosis reactiva mínima.-(d.r.m.). Es la menor cantidad de toxina, contenida en 0,2 ml, que, inyectada intradérmicamente a un cobayo, causa una reacción en la forma de eritema y edema, de 5 mm. de diámetro, visible 36 horas después de la inyección.

La unidad de antitoxina fué originalmente tomada por Ehrlich(1897) como la cantidad de antitoxina que neutraliza completamente 100 d.m.m. de cierta toxina. Esta unidad permanece como la base fundamental de comparación de los valores antitóxicos del suero y el poder de combinación de la toxina.

La unidad de antitoxina es la cantidad de antitoxina seca standard, contenida en ciertos pesos conocidos y conservada en diversos Institutos.

El L_0 (límite nulo) dosis de toxina es la mayor cantidad de toxina que no causa edema local cuando es mezclada con 1 unidad de antitoxina e inyectada subcutáneamente al cobayo.

El L_+ (límite de muerte) dosis de toxina, es la menor cantidad de toxina, que cuando se mezcla con 1 unidad de antitoxina e inyectada subcutáneamente en cobayos de 250g., puede matarlos dentro de los 5 días.

El L_r (límite de reacción) dosis de toxina, es la menor cantidad de toxina, que cuando se mezcla con 1 unidad de antitoxina, e inyectando 0,2 ml intradermicamente al cobayo, causa una reacción mínima en la piel

El L_f (límite de floculación) dosis de toxina, es la cantidad de toxina por unidad de una cierta antitoxina típica elegida, en la mezcla que flocula más rápidamente, bajo las mismas condiciones, que todas las otras mezclas conteniendo otras cantidades de la misma toxina por unidad de la misma antitoxina.

El K_f (tiempo de floculación) tiempo que tarda en flocular la mezcla óptima de toxina o toxoide con su antitoxina.

CAPITULO V

ANTECEDENTES SOBRE INACTIVACION DE LA TOXINA DIFTERICA POR FORMOL Y CETENE.

Numerosos trabajos han sido publicados sobre la acción del formol y cetene sobre toxina diftérica, SCHMIDT(14), FOLLENSBY y HOOKER(15), WADSWORTH, QUIGLEY y SICKLES(16) usaron el primero de los reactivos citados; GOLDIE(17), SANDOR y GOLDIE(18) el segundo; pero consideraremos solo los resultados obtenidos con toxina purificada.

Desde que la toxina diftérica es presumiblemente una proteína, podría suponerse que todo tratamiento físico o químico que desnaturalizara esta proteína provocaría al mismo tiempo pérdida de su actividad.

Entre los numerosos reactivos químicos utilizados con este fin, solo el formol modifica la toxina, suprimiendo totalmente la toxicidad, sin causar ninguna alteración de los otros signos experimentales ni de su propiedad antigénica.

EATON(13) trabajando con toxina purificada, comprueba que el tratamiento de ésta con formaldehído, causa una definida reducción del amino nitrógeno determinable por el método de VanSlyke. Así, 0,0025 por ciento de formaldehído agregado a una toxina purificada con un valor de 300 Lf/ml representa alrededor de la cantidad teórica que combina con el amino nitrógeno, de acuerdo a la reacción siguiente:



Esta concentración de formol, transforma la toxina en toxoide a pH 8,6; pero a pH 6,3, para el mismo efecto, la concentración debe ser 100 veces superior.

En estas condiciones solo el 30% de los amino grupos se han combinado con el formaldehído. Este porcentaje no varía aún en presencia de un gran exceso de formol libre.

En un intento de localizar los grupos tóxicos de la toxina diftérica, PAPPENHEIMER(19) trata con cetene una toxina altamente purificada, por considerar este tratamiento, un método más adecuado para este fin.

A partir de una toxina cruda de 42 Lf/ml, obtiene un producto incoloro con 16% de N; 0,00046 mg de N/Lf; 14.000 d.m.m. por mg, y con una rotación específica de -39° . Ya se ha indicado, que este tipo de toxina contiene 2,2 de histidina, 3,7 de arginina y 5,3 de lisina. Esta cifra de lisina correspondería a un contenido en amino N del 3,2% del total del N de la proteína.

Sin embargo, la media de contenido en amino N de la proteína tóxica determinada por VAN SLYKE es de 6,1%, por titulación por formol es de 6,3% y por titulación con acetona es de 7,4% del N total.

Después de acetilación de la toxina diftérica por cetene, el amino N cae inmediatamente a 2,75% y queda constante en este valor después de períodos más largos de acetilación. Al mismo tiempo, la toxicidad de la proteína, se ha perdido casi interamente.

En estas condiciones y en base a los valores ^{obtenidos} con el método de VAN SLYKE, el autor encuentra que el 3,35% del N total ha sido acetilado.

PAPPENHEIMER concluye que los ϵ -amino grupos de la lisina son los grupos actualmente afectados durante la detoxificación, sin que se pueda explicar el elevado contenido en amino N encontrado para la toxina misma o para el amino N residual que persiste después de la acetilación.

Como en el caso de la pepsina, de la insulina y del virus mosaico del tabaco, los grupos hidroxilos de la tirosina contenidos en la toxina diftérica, son acetilados más lentamente por cetene que los amino grupos. A medida que aumenta el número de los hidroxil-acetil grupos, el Kf se prolonga, hasta que finalmente, cuando alrededor del 35% de ellos, han sido acetilados, la toxina no flocula con anti-toxina, aunque incompleta combinación tiene lugar cuando la toxina acetilada es acoplada a una toxina fresca de Kf breve.

La acción de baja concentración de formol sobre la toxina diftérica a pH 8,1 o a más alta concentración a pH 6,3, aparece análoga a una corta acetilación con cetene, en que se produce una reducción de amino N libre correspondiendo al calculado del contenido en lisina.

La unión con formol es irreversible y por tanto no puede ser atribuida a una mera formación de uniones metileno al N.

En opinión de PAPPENHEIMER, el hallazgo de que la acetilación de ϵ -amino grupos de lisina causa pérdida de toxicidad, no significa que estos grupos sean responsables de la toxicidad por ellos mismos, pero lo son así solamente en virtud de su disposición espacial en la molécula proteica tóxica.

Esto hace muy improbable que ningún grupo prostético análogo al heme de hemoglobina o riboflavina de la enzima amarilla, pueda ser encontrado en toxina diftérica.(PAPPENHEIMER)

CAPITULO VI

ANTECEDENTES SOBRE INACTIVACION DEL TOXOIDE

DIFTERICO POR EL ISOCIANATO DE

FENILO

Se conoce el trabajo de MOLONEY Y ORR(20) que titulan: "El efecto de ciertos tratamientos químicos sobre la antigenicidad y reactividad específica del toxoide diftérico purificado" en el que hacen reaccionar el toxoide con sales de diazonio, con isocianato de fenilo, cloruros de ácidos y ioduros alquílicos sobre toxoide precipitado por nitrato de plata.

Estos autores llegan a las siguientes conclusiones:

1ª) Del toxoide purificado copulado con sal de diazonio, o ácido sulfanílico, anilina o α -naftilamina se obtienen productos que son insolubles debajo del punto isoelectrico del toxoide y solubles por arriba de él. Estos productos muestran una pérdida completa de la especificidad original al ensayarlos en la prueba de reactividad en animales sensibilizados, como en la floculación y en su habilidad para producir antitoxinas.

2ª) Del toxoide diftérico purificado tratado con isocianato de fenilo o con cloruro de benzoílo, se obtienen productos que son insolubles debajo del punto isoelectrico del toxoide y solubles por arriba de él. Con respecto al poder de combinación con antitoxina obtienen resultados variables. Los valores de floculación en

productos preparados en distintas ocasiones fueron inconsistentes.

En algunos casos desapareció todo el valor de floculación, mientras que en otros se observaba algo de él.

Estos autores atribuyen a la diferencia de comportamiento en el valor de floculación de los toxoides alterados, posiblemente a la cantidad variable del nuevo radical introducido en la molécula del toxoide. Ellos trabajan con exceso de reactivo.

P A R T E E X P E R I M E N T A L

CAPITULO VII

A.- EFECTO DEL ISOCIANATO DE FENILO SOBRE TOXINA

DIFTERICA.

Para estudiar el efecto del isocianato de fenilo sobre toxina diftérica, utilizamos toxina purificada, sobre la cual hicimos actuar dosis variables del reactivo a tiempo constante de agitación o variando dosis y tiempo, manteniendo siempre temperatura y pH constante.

I.- Material

La toxina diftérica usada por nosotros fué obtenida de un medio de agua de carne, peptona, hidrolizado de caseína y factores activadores de toxigénesis, factores Iny 2 de MUELLER(21) de acuerdo a las indicaciones publicadas por SORDELLI y colaboradores(22).

La purificación se realizó en base al procedimiento de PAPPENHEIMER(19):

Tres litros de toxina diftérica de 48 Lf/ml se precipitan con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 1/3 de saturación. Se deja en el frío hasta el día siguiente. Se filtra por papilla de papel de filtro para separar impurezas, obteniendo un líquido que contiene 40 Lf/ml, el cual se reprecipita con otro 1/3 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dejándolo en el frío 24 horas; filtración por papilla y redisolución del precipitado en 300 ml de agua destilada, obteniéndose una solución que contiene 300 Lf/ml.

Se repite el proceso anterior y el precipitado final se disuelve en 200 ml de agua destilada, dando una solución que contiene 250 Lf/ml. Se deja en frío hasta el día siguiente; se filtra luego por filtro Seitz y se coloca en dos bolsitas de papel de celofán estériles, dializando 5 días frente a una solución de HNaCO_3 al 1 o/oo (pH 7.8) hasta ausencia de sales de amonio (con reactivo de Nessler). Filtración por filtro Seitz y conservación en cámara fría. (-2°C).

En la tabla N°1 se indican las características de la toxina cruda y purificada.

TABLA N°1.- Valores comparativos de la toxina cruda y purificada.

	Toxina cruda	Toxina purificada
Lf	48 por ml	180 por ml
L†	0.03 ml	0.008 ml
d.m.m.	0.00033 ml	0.00008 ml
d.r.m.	0.0000002 ml	0.00000004 ml
Lr/300	0.00001 ml	0.000004 ml
N total	4,3 mg/ml	0,52 mg/ml
N/Lf	0,088 mg	0,002 mg

II.- Método experimental

Hemos buscado la dosis de isocianato que produjera el máximo efecto, investigando en la zona de 50% de pérdida de Lf, la correlación de los demás valores.

Experimento N°1

Diluimos la toxina con solución buffer de fosfatos pH 7.8 y solución fisiológica, hasta tener el número de Lf/ml que se requieren: se mezclaron:

36.6 ml de toxina

40 ml de solución buffer pH 7.8

143.4 ml de solución fisiológica

Cada ml de esta solución contiene 30 Lf/ml.

Se distribuyeron 25 ml de esta solución de toxina en 10 Erlenmeyer de 150 ml de capacidad, agregándose a 9 de ellos, cantidades variables de isocianato de fenilo, dejando uno como control. Las dosis de isocianato fueron añadidas empleando una pipeta con divisiones al milésimo (tipo pipeta de Kahn).

Todos los Erlenmeyer fueron colocados en un agitador, regulado a unas cien oscilaciones por minuto, con un desplazamiento de 10cm. Esta operación se realiza en cámara fría entre 0° y 2°C, durante 1 hora.

Al cabo de este tiempo cada muestra se filtra por papel para eliminar el producto insoluble formado, de difenilurea, determinándose los valores de las distintas soluciones.

En el cuadro N°1 se indican las cantidades de isocianato de

Cuadro N°1.- Efecto de dosis crecientes de isocianato de fenilo sobre los valores característicos de la toxina diftérica.

MEZCLA N°	TOXINA DILUIDA	ISOCIANATO		Lf/ml	Kf/min.	D.T.m/ml	L _T /300 ml	D.T.m/Lf	PERDIDA de Lf %
		ml	%						
1	25ml.	0.003	0.012	26	5'50"	1×10^6	1.6×10^4	38.461	7
2		0.004	0.016	26	6'30"	1×10^6	2.5×10^4	38.461	7
3		0.006	0.024	24	7'30"	1×10^5	1.25×10^4	4.166	14
4		0.008	0.032	22	8'	1×10^5	1×10^4	4.545	21
5		0.010	0.04	22	8'	1×10^4		454	21
6		0.015	0.06	20	9'30"	1×10^4	1×10^3	500	28
7		0.020	0.08	18	11'	1×10^2	2.5×10^2	5.5	35
8		0.025	0.10	14	13'	1×10^2	1.25×10^4	7.1	50
9		0.030	0.12	12	15'		1.25×10^2	-	5 1/2
10 control		0	0	28	5'	5×10^3	5×10^4	1.785.714	-

fenilo empleadas que oscilaron entre 0.003 y 0.03 ml correspondiendo a una concentración de 0.012 a 0.12% respectivamente; además figuran los valores hallados.

Como puede verse, la muestra control evidencia que la agitación en las condiciones experimentales señaladas, no modifica prácticamente el valor de la toxina. En cambio, con 0.012 a 0.016% de isocianato se comprueba una pérdida de 7% para el valor de floculación, pasando el Kf de 5' a 6'30". Las pérdidas se acentúan con mayores cantidades de isocianato hasta alcanzar la cifra de 56% para la concentración máxima de isocianato utilizada, esto es de 0.12%; simultáneamente el Kf se alarga hasta triplicar su valor.

En los demás valores se aprecia una pérdida correlativa.

Si consideramos la relación d.r.m/Lf, se observan caídas bruscas de este valor en relación con determinadas dosis de reactivo. Así, para 0.016% de isocianato se obtiene un número de 38.000 el cual pasa a 4.000 para concentraciones de 0.024 a 0.032%, luego a 450-500 para concentraciones de 0.040-0.060%, para bajar bruscamente a 5 hasta luego anularse. Es decir, que con la dosis máxima de isocianato empleada se consigue un compuesto totalmente atóxico pero con un 56% de pérdida en su valor Lf. (Ver gráfico N°1)

Experimento N°2

En este ensayo se busca el efecto límite del isocianato.

Seis litros de toxina diftérica que contiene 45 Lf/ml, con un Kf de 2'30", siendo el N total de 4,2mg/ml o sea 0,093 mg de N/Lf,

GRAFICO

CORRESPONDENTE

AL GUADRO N° 1



GRAFICO N° 1

GRAFICO

CORRESPONDENTE

AL GUADRO N° 2

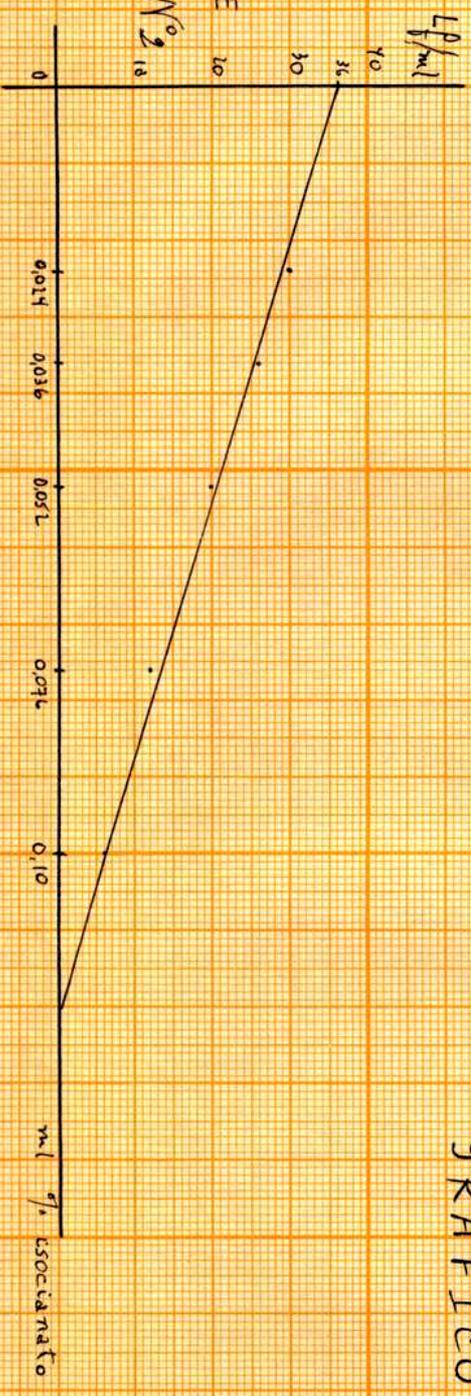


GRAFICO N° 2

se purifican por el método ya descrito y se obtiene una toxina que contiene 1,3 mg de N/ml o sea 0.0037 mg de N/Lf, con un valor de 350-400 Lf/ml.

Diluimos la toxina en la forma siguiente:

25 ml de toxina

40 ml de solución buffer pH 7.8

185 ml de solución fisiológica

Cada ml de esta solución contiene 36 Lf/ml.

Este ensayo que se realiza en las mismas condiciones que el anterior, lo hacemos con mayores dosis de isocianato.

En el cuadro Nº2 se expresan los valores hallados.

Las concentraciones de isocianato que varían de 0.024 a

Cuadro Nº2.- Efecto de dosis crecientes de isocianato de fenilo sobre toxina diftérica, empleando dosis mayores de reactivo que el ensayo del cuadro Nº1

MEZCLA Nº	TOXINA DILUIDA	ISOCIANATO		Lf/ml.	Kf/min.	PÉRDIDA de Lf. %
		ml.	%			
1	25ml.	0.006	0.024	30	2'30"	16

a 0.053 hasta 0.00% producen pérdidas crecientes en valores de Lf de 16%, 44% hasta 100% respectivamente. Como en el experimento anterior, se observa que en la zona del 50% de pérdida del Lf el valor del Kf se triplica. (Ver gráfico N°2)

Experimento N°3

Con objeto de precisar si para una misma concentración de reactivo tiene influencia el tiempo de agitación, realizamos algunos ensayos, variando concentración de reactivo y tiempo, manteniendo el pH y temperatura.

A este efecto, realizamos el ensayo que resumimos a continuación:

A dos series de tres muestras cada una, se añaden 0.01 y 0.03 ml de isocianato respectivamente. Temperatura 1°C y pH 7.8, observando para cada dosis el efecto de la agitación a la hora, a las 24 y 48 horas. Se ha mantenido una muestra control para cada tiempo de agitación.

En el cuadro N°3 se observa que para la concentración de 0.04% de isocianato, se produce a la hora una pérdida de Lf de 21%, llegando a 42,8% a las 24 horas, sin que aparezca un mayor efecto prolongando el tiempo de agitación; es de notar que el tiempo de agitación no influye sobre el Kf.

Cuadro N°3.- Efecto del tiempo de agitación de dosis variables de isocianato de fenilo sobre toxina diftérica.

			1 hora			24 horas			48 horas		
Dosis de toxina	Isocianato		Lf/ml	Kp/min.	d.r.m/ml.	Lf/ml.	Kp/min.	d.r.m/ml.	Lf/ml	Kp/min	d.r.m/ml
	ml.	%									
25 ml.	0.010	0.04	22	8'	1×10^4	16	8'30"	5×10^3	16	4'	5×10^3
	0.030	0.12	0	0	5×10	0	0	5×10	0	0	5×10
control	0	0	28	5'30"	1×10^7	28	5'30"	1×10^7	28	5'30"	1×10^7

CAPITULO VIII

B.- EFECTO DEL ISOCIANATO DE FENILO SOBRE TOXOIDE

DIFTERICO

A pesar de ser mal conocido el mecanismo del proceso de transformación de la toxina diftérica en anatoxina por la acción del formol, nos ha parecido interesante hacer actuar el isocianato sobre toxina y anatoxina comparativamente, a fin de averiguar si el bloqueo producido por el formol, interfiere de alguna manera con la afinidad peculiar del isocianato por determinados grupos funcionales.

A tal efecto, preparamos un toxoide a partir de toxina diftérica purificada, como se detalla a continuación.

I.- Material

A 50 ml de toxina diftérica purificada se le añaden 0.025 ml de formaldehído. Se deja 15 días en estufa a 37°C. Después de este tiempo, se hace control de toxicidad, inyectando 0.1 ml intradérmicamente en la piel de un conejo y 2 ml subcutáneamente a un cobayo. Por observarse en el conejo un eritema dudoso, se prolonga la permanencia en estufa siete días más. Se dializa 48 horas y se filtra por Seitz.

II.- Método experimental.-

Se investiga la cantidad de isocianato necesaria para pro-

ducir el 50% de pérdida de Lf, así como el efecto límite para un toxoide, comparativamente con la cantidad para producir el mismo efecto sobre la toxina que ha servido para obtener dicho toxoide.

(En vista de la escasa cantidad de reactivo de que disponíamos realizamos algunos ensayos previos (Experimentos N°1, 2 y 3.)).

Experimento N°1

Diluimos el toxoide con solución buffer pH 7.8 y solución fisiológica, hasta tener el número de Lf/ml conveniente, como sigue:

18,3 ml del toxoide

40 ml de buffer pH 7.8

51,7 ml de solución fisiológica

Cada ml de esta solución contiene 24 Lf/ml.

Se distribuyeron 25 ml de esta mezcla en 4 Erlenmeyer de 100 ml de capacidad, dejándolos media hora a 0°C. A 3 de ellos se les añade cantidades variables de isocianato de fenilo, dejando el 4º como control. Después de 1 hora de agitación, se filtra y se determinan los valores de Lf y Kf de las distintas soluciones.

En el cuadro N°4 se expresan los resultados.

Como se desprende de este cuadro, la dosis máxima de isocianato utilizada, que en la toxina ya produce 50% de pérdida en Lf, determina en el toxoide solo un 8% de pérdida; por lo tanto realizamos un segundo ensayo con dosis mayores de isocianato.

Cuadro N°4.- Efecto de dosis variables de isocianato de fenilo sobre toxoide diftérico.

Toxoide diluido	Isocianato		Lf/ml	K _f '/min.	Pérdida de Lf. %
	ml	%			
25	0.004	0.016	24	19'	0
	0.010	0.04	24	23'	0
	0.030	0.12	22	23'	8
control	0	0	24	16'	—

Experimento N°2

El procedimiento es igual al del experimento N°1, solo que las cantidades de isocianato varían de 0.020ml a 0.040 ml.

En el cuadro N°5 se expresan los resultados.

En estos dos ensayos, las dosis de isocianato empleadas no produjeron pérdidas significativas a pesar de haber sobrepasado las cantidades que en los ensayos con toxina, determinaban una destrucción completa del valor Lf. En vista de ello, realizamos un tercer ensayo.

Cuadro N°5.- Efecto de dosis crecientes de isocianato de fenilo sobre toxoide diftérico.

Toxoide diluido	Isocianato		L _f /ml	K _f /min	PERDIDA de L _f . %
	ml.	%			
25 ml.	0.020	0.08	26	23'	8
	0.030	0.12	26	22'	8
	0.040	0.16	26	23'	8
" control	0	0	28	16'	-

Para la próxima experiencia,preparamos un toxoide purificado por precipitación con ácido y cloruro de sodio(método que será motivo de una posterior publicación).

El procedimiento es como sigue:

En 4 frascos de centrifuga de 250 ml de capacidad,se colocan 200 ml de toxoide diftérico(peptona Instituto) de 45 Lf/ml;se le agrega a cada uno 3,2 ml de H₂SO₄ al 20%(pH 3.5) y 16 g de NaCl. Se deja una hora a temperatura ambiente para que precipite el toxoide y se centrifuga por 45'. Se decanta el líquido sobrenadante,dejando escurrir sobre papel de filtro. A cada frasco se añade 10 ml de solución buffer de fosfatos a pH 7.6 para disolver el precipitado. Se lleva a 100 ml con agua destilada y se vuelve a centrifugar para

eliminar las impurezas de la sal. Se titula y obtenemos 220 Lf/ml. Se precipita con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 1/3 de saturación. Después de 24 horas en frío, se centrifuga y separa el líquido. Se titula, dando 120 Lf/ml. Dializamos por papel de celofán esterilizado. Se reprecipita el toxoide con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 1/3 de saturación dejándolo nuevamente 24 horas en frío. Se filtra por papel y la titulación da 45 Lf/ml. Filtramos por Seitz, luego se dializa por papel de celofán y se vuelve a titular, hallando 24 Lf/ml. Se conserva en frío. El toxoide así purificado contiene 1% de N/Lf.

Experimento N°3

El toxoide diftérico purificado, se diluye con solución buffer pH 7.6 hasta tener 20 Lf/ml.

Se coloca 25 ml de esta solución en 4 Erlenmeyer de 100 ml de capacidad, agregándose a 3 de ellos, 0.03; 0.04 y 0.06 ml de isocianato respectivamente, quedando el 4º como control. Después de 1 hora de agitación en frío, se filtra y se determinan Lf y Kf.

En el cuadro N°6 se expresan los resultados.

Como puede observarse, para producir en el toxoide un 50% de pérdida del valor Lf, es necesario prácticamente duplicar la dosis de reactivo usado para la toxina.

Cuadro N^o6.- Efecto de dosis crecientes de isocianato de fenilo sobre toxoide diftérico

Toxoide diluido	Isocianato		L ₅₀ /ml	K ₅₀ /min.	PERDIDA en Lf. %
	ml	g.			
25ml.	0.030	0.12	10	19'	17
	0.040	0.16	10	20'	17
	0.060	0.24	6	muy aument.	50
" control	0	0	12	15'	-

En conocimiento de los resultados anteriores, en lo que se refiere a la cantidad de isocianato necesaria para provocar una pérdida del 50% del valor Lf en un toxoide, decidimos una experiencia última, en la cual determinamos el gasto de isocianato para una toxina y su toxoide.

Experimento N^o4

Con el toxoide obtenido de la toxina diftérica purificada del experimento N^o2 realizamos este ensayo.

Diluímos el toxoide, como siempre con buffer y solución fisiológica hasta conseguir un valor de 50 Lf/ml.

La experiencia se efectúa en las mismas condiciones que las anteriores. En el cuadro N^o7 se expresan los resultados:

Cuadro N°7.- Efecto de dosis crecientes de isocianato de fenilo sobre toxoide diftérico

Toxoide diluido	Isocianato		Lf/ml	Kf/min	PERDIDA	
	ml	%			Lf ^m	%
25ml.	0.009	0.036	44	2'30"	12	
	0.019	0.076	44	3'	12	
	0.041	0.164	42	5'	16	
	0.09	0.36	24	8'	50	
" control	0	0	50	2'15"		

Es evidente que este toxoide, aún teniendo en cuenta que contiene un 38,5 más de Lf que la muestra de toxina respectiva, gasta comparativamente un gran exceso de isocianato para un mismo efecto,

Este consumo excesivo de reactivo por el toxoide ha sido comprobado aún en toxoide con bajo valor en Lf, como es el caso del experimento 1.º3.

CAPITULO IX

C.- VERIFICACION DE LAS CARACTERISTICAS ANTIGENICAS DE LOS PRODUCTOS QUE RESULTAN DE LA ACCION DEL ISOCIANATO DE FENILO SOBRE TOXINA Y ANATOXINA DIFTERICA.

Habiendo comprobado que una dosis adecuada de isocianato, determina una pérdida parcial del valor Lf del toxoide, interesaba averiguar si el compuesto toxoide-isocianato que conserva parte de su poder de combinación, mantiene su capacidad antigénica de producir antitoxina. Para ello, precedimos a una serie de ensayos de inmunización en cobayos, teniendo en cuenta la alternativa de que la capacidad antigénica estuviese total o parcialmente en relación con las pérdidas observadas en el poder de combinación.

En los diferentes ensayos consideramos, para la preparación de la dosis de antígeno, el valor del compuesto en su título actual y en el del toxoide antes de ser tratado.

Los diferentes preparados fueron inoculados por vía subcutánea a cobayos de 300 g. de peso cada uno, en lote de 10 animales. Se administraron dos dosis de 5 Lf/ml con un intervalo de veinte días. A los cuarenta días de la primera inyección, se determinó el valor antitóxico del plasma obtenido de los diferentes lotes. De cada lote

se obtuvo una mezcla homogénea de plasma, extrayendo de cada cobayo, dos ml de sangre sobre 0.05 ml de citrato de sodio al 20%, por punción de corazón. El plasma se separa por centrifugación.

El contenido en antitoxina de los diferentes lotes de plasma fué determinado por el método de Roemer (vía intradérmica en conejo).

Fueron utilizados los siguientes antígenos:

Antígeno Nº 1. - Toxoides original; 50 Lf/ml

Antígeno Nº 2. - Toxoides-isocianato de fenilo (0.36%); valor actual 24 Lf/ml. La solución de 5 Lf/ml fué preparada como si el toxoide tuviese el valor original.

Antígeno Nº 3. - Toxoides-isocianato de fenilo (0.36%); la solución de 5 Lf/ml fué preparada de acuerdo al valor actual.

Antígeno Nº 4. - Toxoides-isocianato de fenilo (0.16%); valor actual 42 Lf/ml; la solución de 5 Lf/ml fué preparada de acuerdo al valor actual.

Antígeno Nº 5. - Toxina-isocianato de fenilo (0.36%); valor actual 0; la solución de 5 Lf/ml fué preparada de acuerdo al valor original de la toxina de 36 Lf/ml.

Midiendo el valor antitóxico entre 1/100 hasta 1 U.A. obtenemos:

Antígeno 1 : Toxoides original : + de 1 U.A.

Antígenos 2;3;4 y 5 : - de 1/100 U.A.

RESUMEN Y CONCLUSIONES.

A pesar del reducido número de ensayos ,a consecuencia de la escasa cantidad de droga de que dispusimos en todo el curso de nuestro estudio, surge evidentemente que la formaldehida interfiere de alguna manera con la afinidad del isocianato por los amino grupos y hace necesario triplicar la dosis de este último reactivo, para conseguir el mismo efecto que sobre la toxina.

Ello puede deberse o a una modificación estructural de la molécula de la toxina, o a un bloqueo parcial de los grupos funcionales que reaccionan con el isocianato.

Señalamos el hecho interesante de no conseguir la producción de antitoxina con un compuesto toxoide-isocianato, que sin embargo conserva gran parte de su valor de combinación.

Es muy probable que la introducción del nuevo grupo funcional confiera al toxoide una nueva especificidad.

Investigaciones subsiguientes ampliarán estos interesantes problemas.

De las experiencias realizadas, se desprenden las conclusiones siguientes:

- 1ª.- El agregado de dosis crecientes de isocianato de fenilo a la toxina diftérica purificada, en las condiciones experimentales descritas, provoca una pérdida progresiva

del valor de combinación, hasta anularlo.

La dosis de isocianato que determina aproximadamente 50% de pérdida de dicho valor, provoca una supresión completa de la toxicidad y un aumento del tiempo de floculación, Kf, hasta llegar a triplicar su cifra inicial.

2º.-Se necesita una mayor cantidad de isocianato para producir 50% de pérdida del valor de combinación de un toxoide comparativamente a su respectiva toxina.

3º.-Aún conservando el compuesto toxoide-isocianato el 50% de su valor de combinación, no hemos conseguido poner en evidencia su capacidad de engendrar antitoxina diftérica.

José María Vázquez

BIBLIOGRAFIA

- 1.- RAPER H.S.; Hofmeister's Beiträge; 9:168, 1907
- 2.- FOLLEY S.J.; Biochem. J. 26, 99, 1932
- 3.- HOPKINS S.J. y WORMALL A.; Biochem. J.; 27:740, 1933
- 4.- HOPKINS S.J. y WORMALL A.; Nature; 134:290, 1934
- 5.- GAUNT W.E. y WORMALL A.; Biol. J.; 30:1915, 1936
- 6.- STERN K.G. y WHITE A.; J. Biol. Chem.; 122:371, 1937-38
- 7.- HERRIOTT R.M. y NORTHROP J.H.; J. Gen. Physiol.; 18:35, 1934
- 8.- LI C.H., ~~SIMPSON A.E.~~ y EVANS H.M.; J. Biol. Chem.; 131:259, 1939
- 9.- MILLER y STANLEY; J. Biol. Chem.; 141:905, 1941
- 10.- BISCHOFF F.; Endocrinology; 32:260-262, 1943
- 11.- WOOD T.R. y ROSS W.F.; J. Biol. Chem.; 146:59, 1942
- 12.- PAPPENHEIMER A.M.; J. Biol. Chem.; 120:543, 1937
- 13.- LATON M.D.; J. Immunol.; 33:419-433, 1937
- 14.- SCHMIDT S.; Z. Immunitäts.; 78:27-45, 1933
- 15.- FOLLENSBY E.M. y HOOKER S.B.; J. Immunol.; 31:141-54, 1936
- 16.- WADSWORTH A., QUIGLEY J.J. y SICKLES G.R.; J. Infect. Dis.; 61(2):237, 1937
- 17.- GOLDIE H.; Comp. Rend. Soc. de Biol.; 120:313, 1935
- 18.- SANDOR G. y GOLDIE H.; Bull. Soc. Chim. Biol.; 20:1130-1146, 1938
- 19.- PAPPENHEIMER A.M.; J. Biol. Chem.; 125:201, 1938
- 20.- MCLOONEY P.J. y ORR M.D.; Trans. Roy. Soc. Can.; 31-V:899, 1937
- 21.- MUELLER J.H.; J. Biol. Chem.; 119:121, 1937
- 22.- SORDELLI A. y colaboradores; Rev. Inst. Bact.; T. 12; N°1:83, 1943
