

Tesis de Posgrado

Estudio de la acción inhibitoria de los extractos alergénicos sobre la isoaglutinación de glóbulos rojos humanos

Berra, Olinda Clara

1952

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.

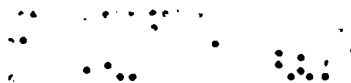
Cita tipo APA:

Berra, Olinda Clara. (1952). Estudio de la acción inhibitoria de los extractos alergénicos sobre la isoaglutinación de glóbulos rojos humanos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0715_Berra.pdf

Cita tipo Chicago:

Berra, Olinda Clara. "Estudio de la acción inhibitoria de los extractos alergénicos sobre la isoaglutinación de glóbulos rojos humanos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1952. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0715_Berra.pdf

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOS RIOS
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FISICAS Y NATURALES



ESTUDIO DE LA ACCION INHIBITORIA DE LOS EXTRACTOS
ALIMENTICIOS SOBRE LA ISOAGLUTINACION DE GLOBULOS
ROJOS HUMANOS

TRABAJO PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTORA EN QUIMICA

Presentada por

OLINDA CLARA BERRA

Edad: 715

1952

Dejo expresa constancia de mi agradecimiento al Señor Director del Instituto Nacional de Enfermedades Alérgicas, Doctor Benigno Garat, por haber facilitado el uso del Laboratorio de dicho Instituto, y muy en especial al Jefe del mismo, Doctor Rubén A. Binaghi, por haber sugerido el tema y dirigido el presente trabajo.-

I.- INTRODUCCION

La existencia de cuatro grupos sanguíneos en el hombre es bien conocida, principalmente por su importancia en las transfusiones.- La división en estos cuatro grupos depende de la presencia en los glóbulos de las sustancias A y B (aglutinógenos), de estructura no bien determinada.- Uno o ambos de estos aglutinógenos pueden estar presentes en los glóbulos, o faltar.-

Además el suero contiene las aglutininas que reaccionan con las sustancias presentes en los correspondientes glóbulos.- Existen, por lo tanto, cuatro posibilidades, como se indica en el cuadro I:

CUADRO I

Grupo	Contiene en		reacciona con suero de grupos			
	Glóbulos	Suero	A	B	AB	O
AB	AB	-	+	+	-	+
A	A	β	-	+	-	+
B	B	α	+	-	-	+
O	-	$\alpha\beta$	-	-	-	-

El suero de un individuo del grupo B es llamado también anti-A porque reacciona con los aglutinógenos de una persona del grupo A.- Por razones similares el suero de un individuo del grupo A es llamado anti-B.-

El grupo A (y por lo tanto el AB) puede ser dividido en sub-grupos (A_1 y A_2)

aglutininas para el grupo O existen excepcionalmente en humanos y en el suero de algunos animales (1,2).-

Al mezclar glóbulos de un grupo humano con suero de otro puede haber aglutinación de los primeros (+) o no (-), según se muestra en el cuadro anterior.-

Como α y β son llamadas también isoaglutininas (entendiéndose por isoaglutinina todo anticuerpo aglutinante producido por material tomado de otro individuo de la misma especie), el fenómeno de aglutinación de los glóbulos de un grupo humano por el suero de otro, se conoce con el nombre de isoaglutinación.

Inhibición de la isoaglutinación:

El método de inhibición de la isoaglutinación es frecuentemente empleado para determinar la actividad serológica de las sustancias antigénicas específicas de los glóbulos (x).- Se basa en la propiedad que tienen estas sustancias de unirse a las isoaglutininas del suero, anulando de este modo su poder aglutinante.-

La técnica empleada para determinar la inhibición de la isoaglutinación consiste en mezclar en una serie de tubos solución antigénica en concentraciones decrecientes con determinada cantidad de suero aglutinante.- Transcurrida una hora a temperatura ambiente, se añade suspensión de glóbulos rojos hu-

(x) Además de estar en los glóbulos, existen sustancias semejantes en los tejidos, fluidos y secreciones de los animales.- También se han encontrado, especialmente con especificidad α , en otros materiales (pepsina, mucina del estómago del cerdo, etc.).-

manos correspondientes.- La mezcla se agita y después de dos horas se observa la isoaglutinación.- En este caso se han usado concentraciones variables de antígeno y constantes de suero, pero puede procederse a la inversa y usar concentraciones decrecientes de suero y constante de antígeno.- No se observará aglutinación en los n primeros tubos y sí a partir del tubo n+1 en adelante.- La explicación de este hecho consiste en que en los n primeros tubos el antígeno está en cantidad suficiente para anular el anticuerpo del suero.- Desde el tubo n+1 en adelante la fijación no es completa y queda anticuerpo libre, causando la aglutinación de los glóbulos.-

La titulación del suero se efectúa observando la aglutinación en una serie de tubos en los que se mezclan concentraciones decrecientes de suero con suspensión de glóbulos.-

En el año 1947, Rimington, Stillwell y Mansell (3) constataron en el alergeno de polvo de habitación por ellos preparado, ciertas semejanzas químicas con la sustancia A obtenida por Morgan (4) del estómago del cerdo.- Allo dió lugar a que se ensayara la inhibición.- Las experiencias se efectuaron determinando la disminución de poder aglutinante de distintos sueros provocada por la adición de una cantidad fija de alergeno.- Una comparación cuantitativa con las sustancias específicas A y O (el sistema O-anti-O también es inhibido) altamente purificadas y con la sustancia específica B menos purificada mostró que el alergeno empleado presentaba 1,0% y 0,6% de la actividad de las sustancias A y O respectivamente y 25% de la actividad de la preparación de B empleada.-

La propiedad de inhibir la aglutinación de eritrocitos ha sido observada en otros extractos alérgicos preparados a partir de variadas materias primas(5).-

II.- OBJETO DEL PRESENTE TRABAJO

Si la acción inhibitoria se debiera a la sustancia alergénica (x) misma o si llegara a establecerse un paralelismo entre la actividad biológica y la inhibitoria (aún cuando no se hubiera demostrado su identidad) podría llegarse a establecer un método "in vitro" para dosar el alergeno contenido en un extracto.- La importancia de esto estriba en que hasta la fecha no existen métodos "in vitro" apropiados para tal fin.-

El presente trabajo ha sido realizado teniendo como fines inmediatos encontrar una técnica adecuada para efectuar la reacción y estudiar el mecanismo y, en lo posible, las relaciones cuantitativas de la misma.-

(x) Se denomina alergeno, al excitante de una reacción alérgica.- Los alérgenos incluyen algunas sustancias que no son antígenos en el sentido ordinario, ya que el antígeno se define como una sustancia que introducida por vía parenteral provoca la formación de anticuerpos, y que es capaz de reaccionar con los anticuerpos.

III.- PARTE EXPERIMENTAL

1.- OBTENCIÓN DEL ALERGENO

Fundamentalmente se ha empleado extracto de polvo de habitación.- Ello ha sido motivado por la mayor facilidad para obtener la materia prima, su costo reducido respecto de g tras y la frecuencia de pacientes sensibles.- Se piensa, no obstante, que los resultados obtenidos pueden hacerse extensivos a extractos de otros materiales, sin modificaciones trascendentes.-

La técnica de extracción utilizada es, en líneas generales, la descrita por Sutherland (6,7): el material se extrae en solución alcalina débil (NH_4OH N/100; también pueden emplearse NaOH N/100 ó CO_3Na 5%), durante 24-48 horas, a baja temperatura.-

La relación peso de material-volumen de solución empleada, es 1:2.- Una vez clarificado el líquido de extracción (prensado y filtrado), se le agrega benzoato de sodio - (10-20 gramos por litro de solución).-

Se acidifica con ácido clorhídrico 1:5 hasta precipitación total del ácido benzoico (viraje del rojo congo; pH aproximado 3,5), con agitación constante.- El precipitado así obtenido adsorbe la sustancia alergénica de la solución.- Se deja en reposo 24 horas en la heladera, se decanta la mayor parte del sobrenadante y filtra el resto, separándose así el precipitado que se trata con acetona pura, con lo que se consigue solubilizar el ácido benzoico.- El insoluble, que contiene el alergeno, se separa y lava con acetona y éter llegándose

así a obtener un polvo gris-pardo, al que se denominará en lo sucesivo ALERGENO BRUTO.-

Para posteriores purificaciones puede emplearse el método de precipitaciones en soluciones acuosas de acetona.-

El alérgeno bruto se solubiliza en agua destilada, llevando a alcalinidad con NaOH N/10 (reacción alcalina al papel de tornasol).- Para facilitar el proceso se disgrega el sólido con ayuda de un mortero.- Llevado al volumen deseado, se ajusta el pH a 7,5-8 y clarifica por centrifugación, descartándose el insoluble.- La solución se lleva a 25% de acetona en volumen.- Al cabo de 24 horas se descarta el precipitado formado y lleva el sobrenadante a 75% de acetona.- Precipita un sólido que se separa de la solución después de 24 horas, lavándose con acetona y éter.- Eliminado el éter, queda un polvo gris: EXTRACTO o ALERGENO CRUDO.- También éste resulta ser sólo parcialmente soluble en agua alcalina.-

Como concentración adecuada de las soluciones de alérgeno crudo, se usan diluciones al 1% (peso de polvo por volumen de solución), isotónicas, a pH 7,5-8, por haber hallado en la práctica útil dicha proporción para los ensayos de inhibición y cutirreacciones (en este caso glicerinadas al 45%) .-

El extracto crudo es susceptible de ulterior purificación.- A tal fin se redissuelve parte del mismo y reprecipita con acetona 75%, llegando así a la obtención de un polvo, ALERGENO PURIFICADO, con una pequeña parte insoluble en medio acuoso.- Este sólido puede ser disuelto en el volumen de líquido deseado, de manera de obtener una solución bastante más

concentrada que las de uso corriente.-

La esterilización se puede efectuar, y así se ha procedido en el presente trabajo, sometiendo las soluciones de alérgeno a baño maría durante treinta o cuarenta minutos.-

De la parcial insolubilidad de los sólidos en agua a pH 7,5-8, surgió la necesidad de averiguar si el residuo insoluble conservaba actividad "in vivo" o "in vitro", o estaba desprovisto de ellas.- Las experiencias en este sentido se hicieron sometiendo a baño de agua a 55-60° C durante 40 minutos el sólido en solución isotónica 75% obtenido a partir del alérgeno bruto, separando luego el precipitado y tratándolo en la forma habitual.- Las pruebas "in vivo" hechas con las soluciones del polvo así obtenido, no mostraron diferencias respecto de las efectuadas con las soluciones de alérgeno obtenido mediante precipitación con acetona a baja temperatura.- Otro tanto puede decirse de las reacciones de inhibición.- En consecuencia, el residuo insoluble parece ser alguna impureza inactiva, que ha sufrido un proceso de desnaturalización, presumiblemente por el agregado de acetona.-

Es obvio, que en cada etapa del trabajo se constató la permanencia de la actividad alérgica mediante pruebas por cutirreacción en sujetos sensibles.- Simultáneamente se constató la presencia de poder inhibitorio.-

2.- DETERMINACION DE LA INHIBICION DE LA ISCACELACION.-

El procedimiento que se recomienda es el que se detalla a continuación.- A él se arribó después de numerosos ensayos y así fueron realizadas las experiencias, salvo indicación

en contra.-

Se dispone en una gradilla adecuada dos series de tubos que se cargan de la siguiente manera: de una suspensión 1:20 de eritrocitos, extraídos y lavados como se indica más adelante, se coloca una gota en cada uno de los tubos de ambas series.-

En la primera de las dos series de tubos se determina el título de aglutinación, entendiéndose por tal, la mayor dilución de suero que produce aglutinación de glóbulos.- A cada tubo de esta serie se agregan cuatro gotas de solución fisiológica.- Se agita.- Se añaden luego a cada tubo cinco gotas de las diluciones correspondientes de suero.- Se agita nuevamente para homogeneizar.-

La segunda de las dos series servirá para hallar el título de inhibición, entendiéndose por tal, el título de aglutinación cuando al sistema se ha agregado alergeno.- Se prepara en forma análoga a la primera, pero reemplazando una gota de solución fisiológica por una gota del alergeno cuyo poder inhibitorio se desea probar.-

En ambas series el total de gotas agregadas a cada tubo asciende a diez.- En el caso de agregar más de una gota de alergeno en la segunda serie, se disminuyen las de solución fisiológica, de manera que el volumen final sea siempre de diez gotas.- Esta modificación sólo se ha hecho en casos especiales. Habitualmente, y salvo indicación en contra, se ha trabajado en la forma antes detallada.-

Preparadas ambas series se incuban en estufa a 37° C

durante 15 minutos.- Se retiran de la misma los tubos y se centrifugan un minuto a mil-mil quinientas revoluciones por minuto.- Se dejan en reposo 15 minutos y se leen.-

Para efectuar la lectura los glóbulos centrifugados se resuspenden mediante una agitación enérgica y su contenido se examina bajo objetivo de poco aumento de un microscopio (8).- Para ello se coloca una gota de la suspensión sobre un portaobjetos y se lleva éste al microscopio.- Si aparecen grupos de glóbulos cuyo número de componentes es difícil contar (racimos), se dice que hay aglutinación fuertemente positiva (se indica ++).- Si se observan grupos de pocos glóbulos, se lee el tubo como positivo (+).- El último positivo se tiene cuando aparecen numerosos grupos de dos y pocos de tres hexatíes.- El tubo se lee como negativo (-) si se observan todos los glóbulos sueltos, ningún grupo de tres y pocos de dos.- En casos de aglutinación dudosa, se inclina el microscopio con suavidad de manera que puedan observarse los glóbulos atravesar el campo lentamente y distinguir así si los eritrocitos que aparecen aglutinados lo están realmente.- En este caso los grumos se deslizan sin disgregarse.- No así, si los grumos son aparentes.-

Una vez llevado el portaobjetos al microscopio, la lectura debe ser hecha lo más rápidamente posible pues de lo contrario la gota tiende a secarse con el consiguiente aumento en la concentración de suero, razón por la cual puede aglutinarse.-

Resulta cómodo esquematizar el trabajo en cuadros como el siguiente:

CUADRO II

Tubo N°	1.ª Serie: Título de aglutinación						2.ª Serie: Título de inhibición					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Glóbulos: E (de B.A.)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Suero: A 1:2							5					
N° 12275 1:4								5				
1:8	5								5			
1:16		5								5		
1:32			5								5	
1:64				5								5
1:128					5							
1:256						5						
Alérgeno: Polvo de habitación 1 %	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1
Solución fisiológica	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3
Agglutinación	++	+	+	-	-	-	++	+	+	-	-	-

Del Cuadro II se desprende que el suero empleado es del grupo "A", probado contra glóbulos B.- Para la primera serie se prepararon seis tubos (numerados del 1 al 6) cuyo contenido se detalla en las columnas correspondientes; en total 10 gotas, de las cuales 5 pertenecen a solución de suero; de manera que la dilución final de suero es doble de la que se agregó.- Así el título de aglutinación es 1:64 pues el tubo N° 3 es el úl-

timo positivo y en él se ha fa agregado suero 1:32.- Por razón análoga el título de inhibición es 1:16 ya que el último positivo es el tubo N° 8 al que se había agregado suero 1:8.-

Teniendo en cuenta la primera serie, a medida que las diluciones de suero aumentan, la cantidad de aglutininas del mismo va disminuyendo y así desde un tubo n en adelante no se observará aglutinación.- Se considera que en el último tubo que aglutina hay una unidad de aglutininas.- En los anteriores habrá 2,4,8 etc. (se usan diluciones de suero dobles cada una respecto de la anterior).-

Respecto de los sueros humanos aglutinantes a utilizar pueden pertenecer a los grupos A (β), B (α) ó O ($\alpha\beta$); se extraen por punción venosa, en ayunas y se mantienen en la heladera hasta el momento de su uso.- Las diluciones se preparan colocando en una gradilla tantos tubos como diluciones se desea tener.- Se coloca en cada tubo una determinada cantidad de solución fisiológica.- Al primero se le añade la misma cantidad de suero y se mezcla hasta obtener una solución homogénea (suero 1:2); la mitad de dicha solución se pasa al segundo tubo y se procede en igual forma (suero 1:4).- Así se sigue hasta acabar la serie (Suero 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024).-

Los glóbulos rojos (AB, A ó B) se obtienen por punción en un dedo o en el lóbulo de la oreja, preferentemente lejos de las cosidas, recojiéndose unas veinte gotas en un tubo sobre solución fisiológica, por cada serie de lecturas a efectuar.- Se lavan con solución fisiológica (tres veces con

cinco mililitros cada vez) para eliminar totalmente el suero y evitar así efectos secundarios no previstos.- Para descartar el medio de suspensión, después de cada lavado se recurre a centrifugar el tubo entre 3 y 5 minutos a mil-mil quinientas revoluciones por minuto y a decantar el sobrenadante.- Se aconseja el empleo de soluciones frescas.- Suspensiones de 24 horas dan, en general, títulos menores para un determinado suero y el límite de aglutinación no se observa con tanta nitidez como cuando se trabaja con glóbulos del día.- En ningún caso se aconseja usar suspensiones de más de 24 horas pues después de ese tiempo se produce, a menudo, hemólisis.-

La solución fisiológica 8‰ debe tener su pH ajustado a 7,2-7,3.- Conviene usar soluciones de preparación reciente.- Con soluciones envejecidas se observan resultados anormales.-

Por razones de economía es conveniente que los volúmenes empleados sean lo más pequeños posibles.- Si bien pueden usarse pipetas graduadas al centésimo, su manipulación resulta engorrosa y el trabajo lento.- Lo más cómodo y rápido es medir los volúmenes por gotas, utilizando tubos estirados a modo de pipetas, que produzcan gotas pequeñas (alrededor de veinte y ocho o treinta gotas por mililitro).- Esto permite ahorrar material, pues cada tubo de la determinación lleva en total diez gotas que equivalen a 0,33 ml., aproximadamente.-

Error del método

En el método de titulación usado el punto final puede estar afectado de un error de más o menos un tubo, o sea -

100%. - Una diferencia de un tubo en el título de un suero de una determinación a otra no significa que haya habido un cambio real. -

Las determinaciones que constan en el presente trabajo han sido efectuadas por duplicado. -

La reacción de aglutinación en la forma efectuada, con diluciones de suero dobles una respecto de la anterior, no permite apreciar pequeños cambios en la inhibición. - No se aconseja el empleo de diluciones sucesivas con un factor menor que dos, como se usó, pues aumenta el trabajo no lográndose mejora alguna, ya que se observan varios tubos consecutivos en que el grado de aglutinación es prácticamente el mismo, de modo que subsiste una indeterminación semejante. -

IV.- MECANISMO DE LA REACCION DE INHIBICION

1.- TITULO DE LA INHIBICION DE LA REACCION DE GLOBULOS.-

Para observar la influencia de la cantidad de glóbulos en la inhibición de la isoelectinación se efectuaron ensayos variando la concentración de los mismos en la suspensión, a alergeno constante.- Previamente se estudió el título aglutinante de un determinado suero frente a cantidades variables de glóbulos, constatándose que no sufre modificación, dentro de los límites usados (Cuadro III).-

CUADRO III

Suero: grupo A Glóbulos: grupo B (de L.A.)		Suero: grupo A Glóbulos: grupo B (de B.A.)	
Concentración relativa de glóbulos en la suspensión final (x)	Título de aglutinación	Concentración relativa de glóbulos en la suspensión final	Título de aglutinación
1:400	1:512	1:400	1:128
1:200	1:512	1:200	1:256
1:100	1:512	1:100	1:256
1:50	1:256	1:50	1:256
		1:25	1:256

(x) En esta escala 1:1 corresponde a una concentración igual a la de la sangre normal.-

en forma análoga se varió la concentración de glóbulos en las experiencias que se resumen en el siguiente cuadro (Cuadro IV).-

CUADRO IV

S ueros: grupo O N° 10118		
Glóbulos: grupo A (de A.B.)		
Concentración relativa de glóbulos en la suspensión final (x)	Título de aglutinación	Título de inhibición
1:2000	1:2048	1:256
1:400	1:2048	1:256
1:200	1:2048	1:512
1:70	1:2048	1:256
1:40	1:2048	1:256
1:20	1:2048	1:256
1:20	1:2048	1:256

(x) En esta escala 1:1 corresponde a una concentración igual a la de la sangre normal.-

De las pruebas realizadas resulta que los títulos de aglutinación e inhibición son independientes de la cantidad de glóbulos, dentro de las concentraciones ensayadas (desde 1:20 a 1:2000).-

Si la cantidad de glóbulos es escasa, la lectura se hace difícil; si es muy elevada, se hace engorrosa por lo confusa.- Ha resultado óptimo el empleo de una suspensión final de eritrocitos 1:200 (es decir agregar una parte de suspensión de glóbulos 1:20 y llevar a volumen final diez).- Para casos en que haya muy elevado número de glóbulos en la suspensión, se gana en exactitud, sin que se observe alteración de títulos,

si en el momento de efectuar la lectura se diluye con solución fisiológica.- Si el número es, por el contrario, escaso, inmediatamente antes de leer puede decantarse la mayor parte del sobrenadante y agitar luego para tomar enseguida la gota que se llevará al portaobjetos y observará al microscopio.-

2.- RELACION ENTRE SUERO E INHIBINA.-

En lo que sigue se denominará INHIBINA a la sustancia responsable de la inhibición de la isoaglutinación, que se encuentra en el alergeno de polvo de habitación (y en otros alergenos) (5).-

Se estudió la cantidad de alergeno necesaria para inhibir la isoaglutinación de una misma cantidad de glóbulos rojos en función de la concentración de suero, encontrándose una relación aproximadamente lineal, como se ve en el Cuadro V:

CUADRO V

Suero: grupo O N° 12875	
Título de aglutinación: 1:512	
Glóbulos rojos: grupo AB (de A. B.) Dil. final: 1:200	
Concentración final relativa del alergo (x)	Título de inhibición
1:10	1:8
1:20	1:16
1:40	1:32
1:80	1:64
1:160	1:128
1:320	1:256

Suero: grupo O N° 12898	
Título de aglutinación: 1:8192	
Glóbulos rojos: grupo AB (de A. B.) Dil. final: 1:200	
Concentración final relativa del alergo (x)	Título de inhibición
1:10	1:64
1:20	1:128
1:40	1:256
1:80	1:256
1:160	1:2048
1:320	1:2048

Suero: grupo O N° 12889	
Título de aglutinación: 1:512	
Glóbulos rojos: grupo AB (de A. B.) Dil. final: 1:200	
Concentración final relativa del alergo (x)	Título de inhibición
1:20	1:16
1:40	1:16
1:80	1:32
1:160	1:64
1:320	1:64
1:640	1:128
1:1280	1:256

Suero: grupo B	
Título de aglutinación: 1:2048	
Glóbulos rojos: grupo AB (de A. B.) Dil. final: 1:200	
Concentración final relativa del alergo (x)	Título de inhibición
1:5	1:32
1:10	1:64
1:20	1:128
1:40	1:128
1:80	1:256
1:160	1:512
1:320	1:1024

(x) Para efectuar estas experiencias se preparó una solución de alérgeno de polvo de habitación veinte veces más concentrada que las comúnmente empleadas, obteniéndose a partir de ésta diluciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 con las que se trabajó.- Se entiende por concentración final relativa de alérgeno 1:10, una parte de alérgeno concentrado en 10 de suspensión final.- La concentración relativa final de alérgeno 1:160 corresponde aproximadamente a la concentración de alérgeno en las experiencias comunes.-

3.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL COMPLEMENTO.-

Es sabido que el complemento es uno de los componentes del suero relativamente termolábil, destruyéndose en pocos minutos a 54-56° C; guardado el suero en las mejores condiciones dura pocos días.-

Se ha comprobado que en las reacciones de inhibición puede usarse suero después de un tiempo relativamente largo (dos meses), si se lo mantiene estéril, a baja temperatura, lo que hace presumir que el complemento no interesa en dicho fenómeno.

Para comprobarlo de una manera directa se calentó el suero durante una hora a 56° C, condiciones en que se destruye el complemento.- Después de este tratamiento no se observa modificación en la relación entre el título de aglutinación y el de inhibición.- En algunos casos se encuentra que ambos están disminuidos, lo cual se atribuye a una parcial destrucción de las aglutininas.- Se consignan datos que apoyan lo anterior en el Cuadro VI:

CUADRO VI

Suero	Glóbulos	Título de aglutinación		Título de inhibición		Relación(x)	
		sin calentar	calentado	sin calentar	calentado	sin cal.	cal.
A(6964)	B(de CB)	1:512	1:256	1:16	1:8	32	32
A(7409)	B(de CB)	1:512	1:128	1:256	1:64	8	2
A(5174)	A(de CB)	1:256	1:32	1:32	1:4	8	8

(x) La relación está dada por: $\frac{\text{Título de aglutinación}}{\text{Título de inhibición}}$

4.- ESTUDIO DE UN POSIBLE EFECTO DANYSZ.-

Danysz observó que cuando a una cierta cantidad de antitoxina diftérica o tetánica se añade una cantidad equivalente de la toxina correspondiente en una sola vez, la mezcla resulta no tóxica, pero si la misma cantidad se añade a intervalos, la mezcla final resulta tóxica.- Tal fenómeno se conoce bajo el nombre de Efecto Danysz y se debe a que, en el segundo caso, se forma inicialmente, al efectuar los primeros agregados, un complejo con una mayor proporción de antitoxina que la necesaria para la neutralización y que no es capaz de reaccionar con la nueva porción de toxina añadida luego.-

Para estudiar un posible efecto Danysz, se hicieron una serie de ensayos de la siguiente manera: se dispusieron cinco series de tubos.- La primera sirvió para determinar el título de aglutinación.- Una vez colocadas las diluciones de suero se agregó a las cuatro restantes: cuatro gotas de alergen, de la siguiente manera:

Serie 2a.: Se agregaron las cuatro gotas de una sola vez

Serie 3a.: Se agregaron las cuatro gotas en dos veces: dos gotas y dos gotas, incubando los tubos entre ambos agregados durante 5 minutos a 37° C.-

Serie 4a.: Se agregaron cuatro gotas en tres veces: una gota, una gota y dos gotas, observando la misma técnica que para la serie tercera.-

Serie 5a.: Las cuatro gotas se agregaron en cuatro veces: una gota, una gota, una gota y una gota, en las mismas condiciones de las series tercera y cuarta.-

Finalmente se completó con solución fisiológica la serie testigo, se agregó a cada uno de los tubos una gota de suspensión 1:20 de eritrocitos (grupo A), se incubó quince minutos a 37° C, se centrifugó cada tubo un minuto a mil quinientas revoluciones por minuto, se dejó reposar quince minutos a temperatura ambiente y se efectuó la observación microscópica con los siguientes resultados:

Serie 1ª:	Título de aglutinación:	1:256
" 2ª:	Título de inhibición:	1:16
" 3ª:	" " "	1:16
" 4ª:	" " "	1:16
" 5ª:	" " "	1:16

No se observaron diferencias en los títulos de inhibición de las cuatro series, lo que elimina la posibilidad de existencia de Efecto Danysz en las condiciones ensayadas, que son las utilizadas normalmente en las experiencias a este respecto.-

5.- DISTRIBUCION DE LA INHIBINA EN EL SISTEMA.-

Una experiencia previa indicó que la inhibina no es adsorbida por los glóbulos, como podría suponerse por similitud con otros fenómenos de inhibición (17) por ejemplo en el caso de anticuerpos Rh.-

La experiencia fué efectuada de la siguiente manera: se mezclaron quince gotas de suspensión 1:10 de glóbulos en solución fisiológica y quince de alergeno de polvo de habitación 1%.- Se centrifugó y separó el sobrenadante (S).- A los glóbulos se agregaron treinta gotas de solución fisiológica.- Se agitó, centrifugó y decantó.- Se procedió en igual forma hasta lavar cuatro veces los glóbulos.- Después del cuarto lavado, se suspendieron en quince gotas de suero fisiológico (Suspensión de glóbulos tratados) y se efectuaron las siguientes experiencias (con la técnica usual):

- a) 2 gotas de suspensión de glóbulos tratados + 8 gotas de suero aglutinante.....Hubo aglutinación.-
- b) 2 gotas de suspensión de glóbulos no tratados + 8 gotas de suero aglutinante (testigo).....Hubo aglutinación.-
- c) 2 gotas de suspensión de glóbulos no tratados + 2 gotas del líquido sobrenadante (S) + 2 gotas de suero aglutinante.....No hubo aglutinación.-
- d) 2 gotas de suspensión de glóbulos no tratados + 2 gotas de solución fisiológica + 2 gotas de suero aglutinante (testigo).....Hubo aglutinación.-

Se desprende que la inhibina no fué absorbida por

los glóbulos rojos y que, por el contrario, quedó en el sobrenadante.- Este resultado está de acuerdo, por otra parte, con el hecho de que la cantidad de inhibina necesaria para inhibir en una determinada reacción no depende de la cantidad de glóbulos y sí, en cambio, de la concentración de suero.-

Se estudió, entonces, con el fin de aclarar en lo posible el mecanismo de la acción inhibitoria, la distribución de la inhibina en el sistema, del siguiente modo:

A) En la zona de inhibición.-

a) En la zona donde hay aglutinación (es decir inhibina insuficiente para inhibir).-

a) En la zona de inhibición

se preparó un tubo conteniendo:

Glóbulos A, de R.E. (1:20)	1 ml.
Suero E, N° 10164 (1:6,4)	0,8 ml.
Alergeno de polvo de habitación 1F	2 ml.
Solución fisiológica	<u>6,8 ml.</u>
Total:	10,0 ml.

Resulta una dilución de suero 1: 128.-

Por una experiencia anterior se conocían el título de aglutinación (1:256) y el de inhibición (1:32).-

Se incubó el tubo antes detallado quince minutos a 37° C, se centrifugó y leyó pasados quince minutos durante los cuales se dejó a temperatura ambiente.- Tal como se suponía por el ensayo previo no se observó aglutinación.- Volvió a centrifugarse el tubo y se decantó el sobrenadante (Sobrenadante 1).-

Los glóbulos fueron lavados dos veces con solución fisiológica y suspendidos en un mililitro de solución fisiológica; con ellos se determinó el título de aglutinación del suero repitiéndose el dato antes hallado: 1:28.-

El sobrenadante 1 se concentró a 2/10 del volumen a baño maría, con lo que se destruyen las aglutininas del suero.- Después de centrifugar para eliminar el precipitado originado durante el calentamiento, se empleó este sobrenadante en una nueva experiencia (en lugar de alergeno), de la siguiente manera (volúmenes en décimas de mililitros):

1ª Serie

Glóbulos A (1:20)	1	1	1
Suero B	1:1,6	1	
	1:3,2		1
	1:6,4		1
Sobrenadante 1 (x)	8	8	8
Agglutinación	+	-	-
Título	1:16		

2ª Serie (testigo)

Glóbulos A (1:20)	1	1	1
Suero B	1:1,6	1	
	1:3,2		1
	1:6,4		1
Alergeno 1ª	2	2	2
Soluc. fisiológica	6	6	6
Agglutinación	+	-	-
Título	1:16		

El alergeno empleado en la serie testigo fué sometido con anterioridad a igual tratamiento que el Sobrenadante 1 (baño maría), pero sin concentrar.-

(x) Ocho partes de este sobrenadante corresponden a dos de alergeno pues el tubo inicial contenía dos partes de alergeno en diez y fué concentrado a ocho décimas de su volumen.-

Una vez leídos los tubos de la primera serie, se centrifugó nuevamente el tercero (negativo), se separó el sobrenadante (Sobrenadante 2), se lo concentró a 2/10 de su volumen, se lo centrifugó y empleó para efectuar otra serie análoga, que dió los siguientes resultados (volúmenes sedidos en gotas):

1ª Serie				2ª Serie (testigo)			
Glóbulos A (1:20)	1	1	1	Glóbulos A (1:20)	1	1	1
Suero B	1:1,6	1		Suero B	1:1,6	1	
	1:3,2		1		1:3,2		1
	1:6,4			1	1:6,4		
Sobrenadante 2	8	8	8	alergeno 1%	2	2	2
Agglutinación	+	-	-	Soluc. fisiológica	6	6	6
Título	1:16			Agglutinación	+	-	-
				Título	1:16		

En la serie control se usó alérgeno sometido dos veces a calentamiento, tal como el Sobrenadante 2.-

Los datos de la experiencia se pueden resumir así:
(Cuadro VII):

CUARTO VII

Título aglutinante del suero.....	l:256
Título de aglutinación con glóbulos tratados.....	l:256
Título de inhibición del suero con alergeno de	
polvo de habitación 1 %.....	l:32
" " " del suero con sobrenadante 1.....	l:16
" " " del suero con alergeno 1% sometido a calentamiento.....	l:16
" " " del suero con sobrenadante 2.....	l:16
" " " del suero con alergeno 1% so- metido 2 veces a calentamiento.....	l:16

De estos datos se concluye que en la zona donde hay inhibición, la inhibina no es adsorbida por los glóbulos y queda en el sobrenadante de donde se la recupera por calentamiento a 100° C, siendo la recuperación aparentemente completa.-

b) En la zona donde hay aglutinación.-

Se determinaron los títulos de aglutinación e inhibición de un suero; siendo el primero 1:256 y el segundo 1:32 con alergeno de polvo de habitación 1%.- se preparó luego un tubo con tales proporciones que resultara de aglutinación positiva

Glóbulos A de A.B. (1:20)	0,5 ml.
Suero N° 7510 (1:1,6)	0,5 ml.
Alergeno de polvo de habitación 1%	1,0 ml.
Solución fisiológica	<u>3,0 ml.</u>
Total:	5,0 ml.

Resulta suero diluido 1:16.-

Después de incubar, centrifugar, etc. en la forma acostumbrada se leyó al microscopio: hubo aglutinación, tal como se preveía.- Volvió a centrifugarse para separar los glóbulos del sobrenadante y éste se separó en dos partes.- Con una de ellas se preparó la serie siguiente:

Glóbulos A (1:20)	1	1	1	1	1	1	1
Suero 1:1,6	1						
1:3,2		1					
1:6,4			1				
1:12,8				1			
1:25,6					1		
1:51,2						1	
1:102,4							1
Sobrenadante 1	5	5	5	5	5	5	5
Solución fisiológica	3	3	3	3	3	3	3
Aglutinación	++	++	+	+	+	-	-
Título	1:256						

Se observa que el agregado de sobrenadante no ha tenido efecto sobre la aglutinación.-

La otra porción de sobrenadante se calentó a baño maría hasta reducir su volumen a 8/10 del inicial y después de centrifugarse se usó para reemplazar la inhibina en una serie de tubos:

Glóbulos A (1:20)	1	1	1	1
Suero	1:1,6	1		
	1:3,2		1	
	1:6,4			1
	1:12,8			1
Sobrenadante 2	8	8	8	8
Agglutinación	+	+	-	-
Título		1:32		

Se volvió a obtener un título de 1:32, igual al título de inhibición obtenido al principio.-

Estas experiencias sugieren que en la zona donde la inhibina no es suficiente para inhibir la aglutinación, resulta que no está libre, según lo corroboran los ensayos con la primera porción de sobrenadante y además que la inhibina puede recuperarse del sobrenadante por calentamiento, aparentemente en su totalidad.-

6.- ESTUDIO DE UNA POSIBLE REVERSIBILIDAD DE LA AGLUTINACION POR LA INHIBINA.-

Se mezcló suero aglutinante y glóbulos correspondientes, incubó a 37° C durante 15 minutos, centrifugó y leyó a los 15 minutos.- El título de aglutinación dió 1:256.- Se agregó inhibina y agitó en el agitador de Kahn por 15 minutos.- De igual manera se procedió con la serie testigo, pero agregando solución fisiológica en lugar de alergeno.- Ambas series se centrifugaron y leyeron a los 15 minutos.-

No se observó variación en el título aglutinante,

lo que prueba que la inhibina no desaglutina los glóbulos.-

7.- LA INHIBINA NO SE FIJA A LOS GLOBULOS AGLUTINADOS.)

Suponiendo una interacción entre α o/y β e i (inhibina) como se desprende de las experiencias anteriores y sabiendo que i no es absorbida por los glóbulos, resulta de interés averiguar si la i se fija a los glóbulos aglutinados.- Para ello se preparó un tubo de la siguiente forma:

Glóbulos A (1:20)	0,4 ml.
Suero C, N° 10574, 1:6,4	0,2 ml.
Solución fisiológica	<u>3,4 ml.</u>
Total	4,0 ml.

Resulta suero: 1:128.-

Se incubó 15 minutos a 37° C, centrifugó y leyó transcurridos 15 minutos a temperatura ambiente; hubo fuerte aglutinación (++).-

Por una experiencia previa se conocían el título de aglutinación del suero (1:1024) y el de inhibición (1:256).-

El tubo preparado, una vez leído se centrifugó; se separó el sobrenadante y lavaron los glóbulos dos veces con solución fisiológica.- Una vez lavados se les agregó 0,8 ml. de alérgeno completando el volumen a 4 ml. con solución fisiológica.- Se agitó 5 minutos en el agitador de Kahn e incubó 15 minutos a 37° C.- Se centrifugó, separó la mayor parte del sobrenadante (sobrenadante 1) y leyó después de 15 minutos.- Aunque hubo marcada hemólisis, se pudieron observar los glóbulos aglutinados.-

El sobrenadante 1 se dividió en dos partes: una de

ellas se usó tal cual; la otra se sometió a baño maría durante 10 minutos; con ambas se prepararon las siguientes series (I y II):

SERIE I					SERIE II				
Glóbulos A (1:20)	1	1	1	1	Glóbulos A (1:20)	1	1	1	1
Suero O 1:6,4	1				Suero O 1:6,4	1			
1:12,8		1			1:12,8		1		
1:25,6			1		1:25,6			1	
1:51,2				1	1:51,2				1
Sobrenadante tal cual	8	8	8	8	Sobrenadante cal. 10 min. a 100° C	8	8	8	8
Aglutinación	++	+	+	-	Aglutinación	++	+	+	-
Título	1:256				Título	1:256			

De acuerdo a los títulos obtenidos toda la inhibina quedó aparentemente en el sobrenadante 1, sin que se observara interacción entre ella y las aglutininas: no hubo fijación de inhibina a los glóbulos aglutinados, ni elución de aglutininas de éstos al sobrenadante.-

8.- RELACION ENTRE LAS AGLUTININAS Y LA INHIBINA.-

Los resultados anteriores parecen indicar que el fenómeno de inhibición se debe a una interacción entre las aglutininas y la sustancia inhibidora.- Como la acción inhibitoria se manifiesta tanto frente a la aglutinina α como a la β , se trató de determinar si ambas especificidades son independientes.-

Con tal fin fueron planeadas una serie de experiencias basadas en que, si ambas especificidades no son independientes, puede pensarse que una misma cantidad de inhibina manifieste distinta potencia frente a una misma cantidad de aglutinina α , según ésta se halle sola o en presencia de aglutinina β (y recíprocamente).-

Las experiencias se llevaron a cabo determinando los títulos de aglutinación e inhibición de sueros de grupos A y B, cada uno por separado y luego en la mezcla de ambos en cantidades equivalentes respecto de las aglutininas (x).-

Los resultados figuran en el Cuadro VIII:

(x) Usualmente se considera que hay una unidad de aglutininas en la última dilución de suero que presenta aglutinación.- En estas experiencias los tubos de cada serie tenían igual cantidad de aglutininas α que de β (en caso contrario se especifica).-

CUADRO VIII

Experiencia Nº	Suero	Glóbulos (A de GA; B de BA)	Título de aglutinación	Título de inhibición	relación Ta/Ti
1	A(12893)	B	1:256	1:32	8
	B(13993)	A	1:512	1:32	16
	A+B(1)	B	1:512	1:32	16
	A+B	A	1:512	1:32	16
2	A(14216)	B	1:512	1:64	8
	B(14116)	A	1:256	1:32	8
	A+B(2)	B	1:512	1:64	8
	A+B	A	1:512	1:64	8
3	A(14152)	B	1:64	1:32	2
	B(14116)	A	1:256	1:32	8
	A+B(3)	B	1:64	1:32	2
	A+B	A	1:256	--	-
4	A(13978)	B	1:512	1:128	4
	B(13993)	A	1:1024	1:128	8
	A+B(4)	B	1:1024	1:256	4
	A+B	A	1:512	1:64	8

(1) La mezcla contiene una parte de suero A y dos de B.-

(2) La mezcla contiene una parte de suero B y dos de A.-

(3) La mezcla contiene una parte de suero A y dos de B.-

(4) La mezcla contiene una parte de suero A y cuatro de B.- En esta experiencia las cantidades de suero en la mezcla no son equivalentes.-

Tanto el título de aglutinación como el de inhibición en el caso de la mezcla han sido considerados respecto del suero aglutinante presente en la misma.- Ej.: en la primera experiencia el último tubo positivo frente a glóbulos B contenía 2,5 partes de dilución 1:256 de suero B y 2,5 partes de dilución 1:128 de suero A en volumen final 10.- El título aglutinante de la mezcla respecto de glóbulos B es, por lo tanto, 1:512; y respecto de glóbulos A es 1:512 ya que el último positivo contenía 2,5 partes de suero B diluido 1:128, por 10 partes de volumen final.-

Como puede concluirse de estas experiencias, la inhibina aparece como poseyendo dos especificidades independientes, ya que los títulos en la mezcla no se han modificado respecto de los títulos de los sueros aislados.-

V.- ACCIÓN DE AGENTES FÍSICOS Y QUÍMICOS SOBRE LA INHIBINA

El alergeno de polvo de habitación, obtenido según la técnica descrita por Latherland, fué sometido a la acción de distintos reactivos.- Sobre las fracciones obtenidas se verificó la permanencia o desaparición de la propiedad inhibitoria.- Desconociéndose la naturaleza química de la inhibina, sirvieron de guía en el presente trabajo varias publicaciones anteriores sobre purificación y fraccionamiento de extractos alérgicos de orígenes varios.- Paralelamente a la reacción de inhibición se hicieron pruebas in vivo (reacciones cutáneas) para determinar si existía correspondencia entre el poder inhibitorio y la actividad biológica.-

1.- CALENTAMIENTO EN MEDIO OSÓNICO 75%.-

A una solución de alergeno crudo de polvo de habitación 1% se agregó acetona, lentamente y agitando hasta una concentración de 75%.- Se calentó en baño de agua a 50-55° C, durante media hora.- Se centrifugó, descartó el líquido sobrenadante y lavó el precipitado dos veces con acetona pura y luego con éter.- Una vez eliminado el éter, el polvo se extrajo con NaOH N/100, se ajustó el pH a 7,5-8 con ClH N/10 y se llevó a solución isotónica (volumen igual al inicial para poder efectuar comparaciones) (Solución 1).- Una parte de la solución así obtenida se destinó a pruebas in vivo; para ello se glicerinó al 45%.- Con el resto se efectuaron pruebas in vitro, usando como testigo alergeno de polvo de habitación no sometido al

tratamiento descripto.- Los resultados pueden verse en el Cuadro IX:

CUADRO IX

Suero	Globulos	Tit.de aglutinación	Alergeno	Tit.de inhibición
B(9645)	A(de OB)	1:128	sin tratar	1:8
			Soluc. 1	1:8
O(10574)	A(de OB)	1:1024	sin tratar	1:256
			Soluc. 1	1:256

Del cuadro se deduce que por calentamiento del alergeno en medio cetónico 75% a 50-55° C durante media hora, no se destruye la inhibina.- Las pruebas in vivo hechas con el alergeno tratado no acusaron diferencias respecto del extracto original.-

-----000-----

Para realizar los posteriores ensayos se utilizó extracto de polvo de habitación al 4%, así preparados: 2 gramos de polvo crudo obtenidos mediante el método Sutherland se solubilizaron en medio alcalino durante 24 horas, se agregó agua destilada, ClNa hasta isotonicidad, se ajustó el pH, completó el volumen a 50 ml. y filtró por filtro Weitz.- Una parte se llevó hasta 45% de glicerina y guardó para pruebas por cutirreacción.-

2.- TRATAMIENTO CON ACIDO TRICLOROACETICO.-

Stone, Harkavy y Brooks (9) trataron de aislar o al menos purificar en lo posible el alergeno de polen de Am-

brosia trifida.- Una vez dializado el líquido de extracción directa, sometieron al líquido de diálisis a la eliminación sistemática de varios componentes proteicos mediante la acción de agentes precipitantes adecuados.- Como conclusiones de su estudio, arribaron a las siguientes:

Después de dializar extracto acuoso del polen citado, aproximadamente la mitad de la sustancia activa aparece en el líquido de diálisis.-

Sometido parte del líquido de diálisis a la acción del calor, no varió su potencia alergénica en pruebas cutáneas.

Por acción del ácido tricloroacético aparentemente muy pequeña cantidad o ninguna de sustancia alergénica es precipitada por dicho ácido.-

El tratamiento con ácido pírico separó pequeña cantidad de sólido.- El sobrenadante no ofreció cambios en reacciones cutáneas respecto del testigo standard.-

El ácido fosfotúngstico precipitó el principio activo.-

Para averiguar la influencia del ácido tricloroacético sobre el extracto de polvo de habitación se procedió de la siguiente manera: se tomaron 5 ml. de la solución al 4%. Con agitación constante se agregaron 2,5 ml. de solución de $\text{CCl}_3\text{-COOH}$ al 20%. Durante 24 horas se dejó en la heladera (pH < 1,2--azul de timol--; imperta para comprobar que el alérgeno no se inactiva en medio ácido).- Hubo pequeña cantidad de precipitado fino, coloreado.- Una vez separado éste precipita-

do por centrifugación, se lavó el sobrenadante con sucesivas porciones de éter hasta que su pH alcanzó el valor de 7,5 (solución 2).-

De la solución libre de tricoloroacético se separó una parte y glicerizó al 45%, guardándose para reacciones in vivo y con el resto de la solución se efectuaron reacciones de inhibición que dieron los resultados que se consignan en el Cuadro X.-

El precipitado separado (10 mg.) se lavó tres veces con acetona y luego con éter.- Eliminado el éter se lo solubilizó en NaOH N/100, se dejó 24 horas a baja temperatura, se llevó a solución isotónica, se ajustó el pH a 7,5-8 y completó a 7,5 ml. (volumen inicial) (solución 3).- Se filtró, separó una parte para llevarla a glicerina 45% (tests in vivo); con el resto se efectuaron reacciones in vitro con los siguientes resultados (Cuadro X) (Como testigo se diluyó el extracto Sutherland 4% con solución fisiológica hasta 8,6%, concentración igual a la de la solución 2, pues aquí se había partido de 8 ml. y llevado a 7,5 ml.).-

CUADRO X

Suero	Glóbulos	Tít.aglutinación	Inhibina	Tít.inhibición
E(13758)	A(de OB)	1:32	Soluc. 2, 6%	1:2
			Soluc. 2	1:2
			Soluc. 3	1:16
B(3379)	A(de OB)	1:64	Soluc. 2, 6%	≅ 1:4
			Soluc. 2	≅ 1:4
			Soluc. 3	1:16
O(13740)	A(de OB)	1:64	Soluc. 2, 6%	≅ 1:4
			Soluc. 2	≅ 1:4
			Soluc. 3	1:32
	B(de BA)	1:256	Soluc. 2, 6%	1:64
			Soluc. 2	1:64
			Soluc. 3	1:256

Los resultados resumidos en el cuadro anterior parecen indicar que la inhibina no es precipitada por el ácido tricloroacético.- El poder inhibitorio que se manifiesta en el precipitado quizá se deba a una adsorción o a una parcial separación de la inhibina de la solución debido al pH bajo a que se trabajó y no al ácido en sí empleado.-

Las pruebas "in vivo" con el sobrenadante dieron positivas; con el precipitado, negativas o dudosas.-

3.- TRATAMIENTO CON ÁCIDO PÍCRICO.-

A 5 ml. de solución de extracto de polvo de habitación al 4% se agregaron 2,5 ml. de solución saturada de ácido pícrico.- Se dejó 24 horas en la heladera.- No hubo precipitado.- Se neutralizó y concentró a baño maría a mitad de volumen.- Se volvió a acidificar hasta pH 2, se clarificó por centrifugación y decantación y extrajo el sobrenadante con sucesivas porciones de éter, hasta que la fracción de éter empleada resultó incolora.- Se ajustó el pH a 7,5 y completó el volumen a 5 ml. con solución fisiológica (volumen inicial) (Solución 4).- Parte de ésta solución se empleó, una vez llevada a 45% de glicerina, para reacciones cutáneas y el resto se probó en reacciones de inhibición, con los siguientes resultados (como testigo se usó la solución de extracto Sutherland al 4%):

CUADRO XI

Suero	Globulos	Tit.aglutinación	Inhibina	Tit.inhibición
A(13978)	B(de EA)	1:512	Suth.4%	1:32
			Soluc.4	1:32
C(14130)	B(de EA)	1:1024	Suth.4%	1:32
			Soluc.4	1:32
C(14031)	A(de OB)	1:512	Suth.4%	1:16
			Soluc.4	1:16
C(2524)	A(de OB)	1:128	Suth.4%	1:4
			Soluc.4	1:4

De los resultados aquí consignados se deduce que la

inhibina no precipita por acción del ácido pícrico.-

Las cutirreacciones sobre pacientes sensibles resultaron positivas.-

4.- TRATAMIENTO CON ACIDO FOSFOTUNGSTICO.-

La precipitación fue efectuada agregando a 5 ml. de la solución de extracto Sutherland al 4%, 0,5 ml. de ácido clorhídrico concentrado y 5 ml. de la solución de ácido fosfotúngstico 15%.- Se dejó hasta el día siguiente en la heladera y separó luego el precipitado del sobrenadante.- El precipitado se lavó dos veces con pequeñas porciones de solución de ácido fosfotúngstico, fría.- Se solubilizó en medio acuoso y extrajo con sucesivas porciones de una mezcla de éter y alcohol amílico, en partes iguales, y luego con éter.- En el líquido acuoso final se probó la ausencia de ácido fosfotúngstico (con Cl_2Ba).- Se ajustó el pH a 7,8; llevó a isotonicidad y completó el volumen hasta igualar el inicial, para poder comparar respecto del testigo.- Se filtró para eliminar su ligera turbidez.- Del filtrado se separó una parte y llevó a glicerina 45%, para efectuar cutirreacciones y con el resto se efectuaron pruebas "in vitro" (Solución 5) que se consignan en el Cuadro XII.-

Líquidos de precipitación y de lavados:

El líquido de precipitación y los de lavado se unieron.- Se concentraron a la mitad a baño maría.- Se extrajeron varias veces con una mezcla de alcohol amílico y éter (1:1 en volumen).- Se comprobó en la solución final la ausencia de fosfotúngstico.- Se neutralizó, llevó a isotonicidad y completó

el volumen a 5 ml.- Parte de ésta solución se destinó a pruebas in vivo (glicerinada 45%) y parte para comprobar su poder inhibitorio (solución 6).- Como testigo se empleó solución de extracto Lutherland 4%.- Los resultados pueden leerse en el Cuadro XII:

CUADRO XII

Sero	Glóbulos	Tít.aglutinación	Inhibina	Tít.inhibición
O(13725)	B(de BA)	1:64	Suth.4%	1:4
			Soluc.5	1:8
			Soluc.6	1:16
A(13826)	B(de BA)	1:128	Suth.4%	1:16
			Soluc.5	1:32
			Soluc.6	1:64
O(13862)	B(de BA)	1:512	Suth.4%	1:16
			Soluc.5	1:32
			Soluc.6	1:64
O(13791)	B(de BA)	1:512	Suth.4%	1:16
			Soluc.5	1:32
			Soluc.6	1:64
O(13698)	B(de BA)	1:256	Suth.4%	1:8
			Soluc.5	1:16
			Soluc.6	1:16

Los resultados indican la presencia de poder inhibitorio en el precipitado.- También muestra actividad in vitro la solución obtenida del tratamiento del sobrenadante de la precipitación y de los líquidos de lavado.-

Los tests in vivo no acusaron diferencias respecto

de las pruebas in vitro.-

5.- TRATAMIENTO CON ALUMBRE POTÁSICO.-

El tratamiento seguido se basó en un trabajo de Zons, Koch e Hirose (11) cuyo objeto fué aislar el precipitado producido por adición de alumbre potásico a un extracto acuoso de polen de *Ambrosia trifida* e investigar su actividad biológica.-

Ya en 1926 Glenn y colaboradores trataron de precipitar la toxina diftérica con alúmina; en 1931 determinó, en colaboración con Barr, las condiciones necesarias para una máxima precipitación.- En 1936 Caulfield aplicó el tratamiento a la *Ambrosia trifida*.-

El $(SO_4)_4Al_2K_2 \cdot 24 H_2O$ fué usado como reactivo de precipitación.- Se añadió en solución acuosa al 10%, en volumen tal que la solución final resultara de una concentración en alumbre del 1% aproximadamente.- Este valor de 1% fué elección arbitraria de los investigadores al principio mencionados, pues no efectuaron ensayos con concentraciones mayores.-

A 4,5 ml. de la solución de extracto Sutherland al 4% se agregó 0,5 ml. de $(SO_4)_4Al_2K_2 \cdot 24 H_2O$ en solución acuosa al 10%, lentamente, con agitación constante.- Se llevó luego el pH de la solución a 7,9-8,0 (rojo fenol como indicador externo) para que precipitara $Al(OH)_3$ y se dejó 24 horas en la heladera. El precipitado flocculento formado, sedimentó.- Se separó del sobrenadante y lavó con solución fisiológica hasta eliminación de $SO_4^{=}$ (se probó su ausencia en el líquido de lavado con Cl_2Ba

en medio clorhídrico); luego se suspendió en solución fisiológica.-

Se obtuvo así un precipitado de hidróxido de aluminio suspendido, que podía o no haber adsorbido la inhibina.- Para averiguarlo debieron efectuarse reacciones de inhibición; pero para las reacciones se necesitaba tener, no una suspensión sino una solución, de manera que se buscó un medio para separar la inhibina (supuesto que había sido adsorbida) del hidróxido de aluminio.- Para ello (x) el precipitado suspendido en solución fisiológica se acidificó con ClH (1:2) hasta disolución del precipitado y se llevó a medio osmótico 75%.- Después de 24 horas de conservado al frío, se separó el precipitado fino, ligeramente coloreado, por centrifugación y decantación del sobrenadante; se lavó con acetona y disolvió, una vez eliminada ésta llevándolo a 4,5 ml. de solución isotónica de pH 7,6-8 (Solución 7).- Una parte de esta solución se destinó, una vez glicerizada, a pruebas in vivo.- el resto se empleó para reacciones in vitro.- Como testigo en blanco, se sometió a tratamiento análogo desde (x), una suspensión de $Al(OH)_3$ obtenida alcalinizando una solución de alumbre potásico al 1% (Solución 2).-

Los resultados se ven en el Cuadro XIII:

CUADRO XIII

Suero	Glóbulos	Tit.aglutinación	Inhibina	Tit.inhibición
C(3524)	A	1:128	Suth.4%	1:4
			Soluc.7	1:4
			Soluc.8	1:128
O(14031)	A	1:512	Suth.4%	1:16
			Soluc.7	1:32
			Soluc.8	1:512
A(de O.N)	E	1:64	Suth.4%	1:8
			Soluc.7	1:16
			Soluc.8	1:64

Con soluciones obtenidas de otra experiencia, se llegó a los siguientes resultados:

CUADRO XIII a

Suero	Glóbulos	Tit.aglutinación	Inhibina	Tit.inhibición
E(15155)	A(de OB)	1:512	Suth.2%	1:4
			Soluc.7'(x)	1:4
			Soluc.7"	1:512
B(15184)	A(de OB)	1:64	Suth.2%	1:2
			Soluc.7'	1:4
			Soluc.7"	1:64

De los resultados consignados en los Cuadros XIII y

(x) Se ha denominado Solución 7' a la correspondiente a la solución 7 de la primera experiencia y solución 7" al sobrenadante de la precipitación de $Al(OH)_3$.

XIII a, se deduce que la inhibina es arrastrada por la precipitación de albúmina.-

Las pruebas efectuadas "in vivo" no acusaron divergencias respecto de los tests "in vitro".-

6.- PRECIPITACIÓN POR SULFATO DE AMONIO.-

Se intentará establecer en qué fracciones es precipitada la inhibina cuando se trata la solución de alergeno con sulfato de amonio a distintas concentraciones.-

A 7 ml. de la solución de alergeno de polvo de habitación al 4% se agregaron 7 ml. de solución acuosa saturada de sulfato de amonio (70 g/100 ml.).- Se dejó en la heladera 24 horas, se centrifugó para separar el escaso precipitado obtenido.- Una vez separado y lavado con acetona se disolvió en solución fisiológica, ajustó el pH a 7,5-8 y completó a 7 ml.- Así se obtuvo la solución del precipitado a media saturación con sulfato de amonio (Solución 9).- Una parte de la misma se separó para determinar su actividad alergénica.-

Al sobrenadante de la precipitación a media saturación se agregó sulfato de amonio hasta saturación.- Fue abundante precipitación.- Después de haber permanecido 24 horas en la heladera se separó el precipitado formado.- El sobrenadante se concentró a baño maría, se ajustó el pH a 7,5-8 y llevó a 7 ml.- Con parte de esta solución (Solución 10) se efectuaron reacciones in vitro; el resto se llevó a glicerina 45% y usó para reacciones in vivo.-

El precipitado antes separado se solubilizó, se a-

justó su pH y completó su volumen a 7 ml. de solución isotónica (volumen inicial) (Solución 11).- Parte de esta solución (con 45% de glicerina) se destinó a pruebas in vivo y parte para determinar su poder inhibitorio.-

Como testigos de las pruebas se emplearon una solución saturada de sulfato de amonio y la de extracto Sutherland 4%.- Los resultados pueden verse en el Cuadro XIV:

CUADRO XIV

Suero	Glóbulos	Tit.aglutinación	Inhibina	Tit.inhibición
O(3524)	A(de OB)	1:128	Suth.4%	< 1:4
			Soluc.9	1:128
			Soluc.10	1:4
			Soluc.11	1:4
			Soluc.12	1:128
A(de OH)	B(de BA)	1:64	Suth.4%	1:8
			Soluc.9	1:64
			Soluc.10	1:16
			Soluc.11	1:16
			Soluc.12	1:64

De los resultados obtenidos en las pruebas realizadas se deduce que el sulfato de amonio a media saturación no provoca la precipitación de inhibina.- A saturación completa hay precipitación incompleta.-

Las pruebas sobre pacientes sensibles dieron los siguientes resultados: extracto 9 glicerinado: negativo o dudo-

so; extractos 10 y 11, glicerinados, positivo.-

7.- TRATAMIENTO CON ACETATO BÁSICO DE PLOMO.-

El procedimiento químico empleado se basó en los trabajos de Spies, Coulson, Bernton y Stevens (10) para aislar y caracterizar un componente alérgicamente activo de la semilla de algodón.- Dicho procedimiento resulta ser más drástico que los comúnmente seguidos, pues incluye precipitaciones con alcohol, ebullición en solución acuosa y precipitación con acetato de plomo.- A grandes rasgos, la técnica por ellos seguida fué la siguiente: a la solución alérgica añadieron alcohol hasta 75%. - Descartaron la solución y recogieron el precipitado que se llevó a solución acuosa de etanol 25%. - Agregaron acetato básico de plomo (del tipo de los usados en análisis de azúcares) al 10 en solución de etanol 25% (para un volumen de alérgeno, medio de acetato básico). - El precipitado de sales de plomo fué separado por centrifugación y descartado y las sales que pudieron haber quedado al estado coloidal se separaron por ultracentrifugación a 50.000 revoluciones por minuto en centrifuga sharples.- A la solución, ligeramente turbia, se añadió alcohol hasta 70% y se dejó a -7° C toda la noche.- El líquido sobrenadante se descartó.- El sólido se liberó de alcohol y se secó al vacío en presencia de pentóxido de fósforo.-

El procedimiento seguido para con la solución de extracto Sutherland al 4% estuvo sujeto a variaciones, dada la imposibilidad de contar con el material de trabajo con que contaron los autores del método descripto.- Se trabajó de las si-

guiente manera: se tomaron 5 ml. de la solución de extracto lutherland al 4% y llevaron a medio cetonico 75%.— Después de 24 horas se separó el precipitado y descartó la solución.— El precipitado se solubilizó en 5 ml. y agregó 1,6 ml. de etanol, de manera que quedara un medio acuoso con 25% de alcohol etílico.— se añadió mitad de volumen (3,3 ml.) de solución alcohólica 25% de acetato básico de plomo al 10%.— Precipitó una sustancia viscosa, marrón, que se separó del sobrenadante por centrifugación, dos horas después de agregado el acetato básico.— El sobrenadante quedó perfectamente limpio e incoloro.— El precipitado se trató con 4 ml. de solución al 10% de CO_3K_2 con lo que pasó el alergeno a solución debido al medio alcalino y precipitó CO_3Pb , separándose así el plomo de la solución.— El carbonato de plomo se eliminó por centrifugación y decantación; el sobrenadante se llevó a solución isotónica, pH 7,5-8, completándose el volumen a 8 ml.— Parte de esta solución, con glicerina 45%, se destinó a catirreacciones.— Con el resto se efectuaron pruebas de inhibición (Solución 13) cuyos resultados pueden verse en el Cuadro XV:

CUADRO XV

Suero	Glóbulos	Tit.aglutinación	Inhibina	Tit.inhibición
C(3524)	A(de OB)	1:128	Suth.4%	$\leq 1:4$
			Soluc.13	$\leq 1:4$
A(de OB)	B(de BA)	1:64	Suth.4%	1:8
			Soluc.13	1:8

De los resultados obtenidos se deduce que el ace-

tato básico de plomo precipita la sustancia que posee poder inhibitorio en el extracto de polvo de habitación.-

Las pruebas efectuadas sobre pacientes sensibles acusaron reacción positiva.-

VI.- DISCUSION

La técnica empleada en la obtención del extracto alérgico es fundamentalmente distinta de las usuales que consisten en:

- a) molida o pulverización, en caso necesario.-
- b) tratamiento de desengrasada con solvente adecuados (éter, toluol, alcohol, etc.).-
- c) extracción en solución alcalina (bicarbonato o buffer de fosfato) con conservador (fenol 0,5%, dextrosa, glicerina (15)).-
- d) purificación por diálisis o precipitación.-
- e) concentración por evaporación en frío.-
- f) esterilización en frío.- Se aconseja la filtración, estando en cambio, contraindicados el agregado de sustancias químicas que podrían provocar irritaciones no específicas y la esterilización por el calor.-

Las precauciones aconsejadas en las etapas de concentración y esterilización obedecen a suponer que el alérgeno tiene constitución proteica.- Algunos autores han sometido a temperaturas más elevadas al alérgeno en alguna etapa de su obtención (7,9,10).- En el presente trabajo los extractos empleados fueron concentrados y esterilizados por calentamiento, sin observar por ello pérdidas en su actividad biológica ni en su poder inhibitorio.-

Las desventajas principales que presentan las soluciones de alérgeno obtenidas según el camino antes descrito (12) son: su relativamente escasa duración (6-12 meses) y la poca pu-

reza del extracto final, incluso después de la purificación por diálisis que sólo elimina parte de las impurezas, pudiendo quedar otras sustancias en solución, responsables, en muchos casos, de reacciones irritativas no específicas. Además, la concentración a alcanzar queda limitada por la relación peso-volumen empleada en la extracción, que no puede aumentarse indefinidamente. Si bien es posible concentrar por evaporación, esta operación no puede llevarse más allá de ciertos límites, ya que se concentran no sólo la sustancia alergénica, sino también las impurezas.-

Algunas dificultades han sido ya subsanadas. The Arlington Chemical Co, USA, comercializó el método descrito por Reinberg(13) basado en una extracción en solución acuosa alcalina débil (NaOH N/20 ó N/50) y precipitación del alergeno por acidificación con ácidos clorhídrico o acético. El polvo que así llega a obtenerse mantiene su actividad, no habiéndose observado la pérdida con el tiempo. Si bien este método subsana el defecto de la pérdida de actividad, el precipitado logrado contiene muchas impurezas.

Boatner y colaboradores(14) obtuvieron un extracto de polvo de habitación potente y de elevada pureza mediante un procedimiento que incluye: extracción en medio acuoso, precipitaciones con acetona a distintas concentraciones(40% y 75%) y con sulfato de amonio (60%); diálisis y concentración. Pero este procedimiento, quizá factible de ser aplicado a otros alérgenos, si bien dá buenos resultados en cuanto a pureza y con-

contracción, resulta poco práctico por la serie de etapas que implica.-

Sutherland ideó un procedimiento más sencillo que conduce a tan buenos resultados como el anterior y es capaz de ser aplicado a otros alérgenos además del polvo de habitación(12) En rasgos generales su técnica fué seguida en la obtención de los extractos empleados en el presente trabajo, llegándose a un grado de pureza que supera en mucho a los alcanzados por métodos comunes. En efecto: 1000 g. de polvo inicial se extraen usualmente con 2000 ml. de solución acuosa alcalina. En los métodos comunes éste se concentra a la quinta parte, con lo que se reduce la solución a unos 400 ml.. Por el método Sutherland se obtiene aproximadamente un gramo de alérgeno bruto por cada kilogramo de polvo inicial; si del alérgeno bruto obtenido se hace una solución al 1% se ha concentrado 1000 g. de materia prima en 100 ml. o sea unas 4 veces más que por los métodos comunes. Del alérgeno crudo se obtiene aproximadamente 0,1 g. por cada gramo de alérgeno bruto(por cada 1000 g. de polvo inicial). Como el alérgeno crudo puede solubilizarse en el volumen deseado, si se lleva por ejemplo a 1 ml. se obtiene una concentración 400 veces mayor que por los métodos comunes.

Precisamente el haber podido poner de manifiesto recién ahora el fenómeno de inhibición se atribuye, en parte, al logro de alérgenos de alta concentración.

En el presente trabajo se observó inhibición por extracto alérgico de polvo de habitación preparado según Sutherland; pero el fenómeno se manifiesta independientemente del me-

todo empleado en la obtención; también se realizaron pruebas de inhibición con extracto obtenido según el método de Efron(14).

La técnica empleada por Hinington, Stillwell y Mansell tiene como inconveniente principal el tiempo requerido para cada determinación. La bibliografía consultada sobre técnicas del método de inhibición de aglutinación de glóbulos rojos (1,2,4) adolece del mismo defecto. Para subsanar tal inconveniente se hicieron numerosas pruebas. En las reacciones serológicas deben considerarse dos etapas: en la primera ocurre la unión específica entre antígeno y anticuerpo; la segunda permite visualizar la reacción, pudiendo entonces observarse precipitación, aglutinación, lisis, etc.- Mientras la primera etapa ocurre con extremada rapidez, la segunda puede llegar a ser muy lenta. Para apresurarla se hicieron una serie de ensayos variando las condiciones físicas hasta llegar a la técnica empleada, que permitió acortar el tiempo necesario para cada determinación.

La bibliografía en general aconseja observar los tubos transcurridas dos horas de realizada la mezcla, a temperatura ambiente. Tal aseveración fué comprobada por experiencias hechas al respecto, en las cuales se variaron el tiempo y la temperatura de incubación.-

La técnica que emplea la centrifugación en la determinación del grupo sanguíneo está ampliamente difundida(1). La determinación del título aglutinante de un suero se abrevia mediante tal procedimiento. En el presente trabajo se probaron distintos tiempos y velocidades de centrifugación, hasta adoptar los definitivos. De las experiencias realizadas se conclu-

yó que, transcurridos los 15 minutos de incubación a 37°C., basta centrifugar los tubos durante 1 minuto a 1000-1500 revoluciones por minuto para poder efectuar la lectura al microscopio 15 minutos más tarde. Durante este lapso los tubos quedan a temperatura ambiente (15-20 °C.). Con tal técnica el tiempo de cada determinación se reduce en más de una hora y media. Si la lectura se efectúa después de varias horas de centrifugados los tubos, conviene mantenerlos en la heladera, bajo riesgo, en caso contrario, de observar resultados falsos.-

Respecto del orden de agregado de los componentes, las precauciones fundamentales son: evitar la unión de glóbulos y suero antes del agregado de inhibina y agregar alergeno directamente sobre los glóbulos, ya que esto puede ser causa de hemólisis. El orden de agregado adoptado (glóbulos-solución fisiológica-alergeno-suero), se eligió por comodidad. Sin embargo es más aconsejable agregar los glóbulos al final (suero-alergeno-solución fisiológica-glóbulos-). El objeto es evitar las concentraciones locales elevadas de suero (concentraciones elevadas de glóbulos no afectan) que pueden producirse cuando cada gota de dilución de éste agregada atraviesa la mezcla glóbulos-solución fisiológica-alergeno. Este orden es particularmente conveniente en el caso de trabajar con sueros poco diluidos.

De los resultados obtenidos en las experiencias tendientes a aclarar el mecanismo de la reacción de inhibición de la isoaglutinación de glóbulos, se desprende que dicho mecanismo parece ser alguna especie de interacción entre la inhibina

y las aglutininas del suero, como lo sugiere la comprobación de que la cantidad de inhibina necesaria para evitar la aglutinación no depende de la concentración de glóbulos y sí, y en relación directa, de la de suero; además se comprobó que los glóbulos no adsorben inhibina. Ya ha sido descripta la semejanza química entre el alergeno de polvo de habitación y la sustancia específica A del grupo sanguíneo (B), semejanza que parece extenderse también al campo serológico, con la probable coexistencia de las especificidades A y B en un mismo material, puesto que el poder inhibitorio se manifiesta frente a ambos tipos de glóbulos. De las experiencias detalladas en el cuadro VIII y puesto que los títulos de inhibición no sufren variación en la mezcla respecto de los títulos de los sueros aislados, se desprende que ambas especificidades actuarían independientemente, lo cual sugiere que quizá haya dos sustancias (una con cada especificidad) en el alergeno. La sospecha parece estar reforzada por el hecho de que el poder inhibitorio frente a glóbulos A y B no es el mismo para un material dado (suero y alergeno) (16).

Respecto de las determinaciones biológicas efectuadas, se deja constancia de la estrecha vinculación encontrada entre la presencia de actividad biológica y de poder inhibitorio, no habiéndose conseguido en ningún caso separar uno de otro. Así lo atestiguan las determinaciones de ambos tipos realizadas con las distintas fracciones obtenidas durante la extracción del alergeno y durante los distintos tratamientos químicos a que se lo sometió. Estos tratamientos a la vez sugieren, respecto de la constitución química de la inhibina, que no se trata de una proteína típica

pues no se destruy6 por acci6n del calor en medio acuoso ni os-
t6nico, ni por efecto de 6cidos t6picos desnaturalizantes de
sustancias proteicas.-

VII - CONCLUSIONES

- 1)- Se describe una técnica para determinar la inhibición de la isoaglutinación de glóbulos rojos humanos por extractos alergénicos, que significa una mejora respecto de las anteriormente descritas en la bibliografía.

- 2)- Se estudió el mecanismo de la inhibición encontrándose que se trata de una interacción entre las aglutininas del suero y la inhibina, caracterizada por:
 - a) existe una relación lineal entre la concentración de inhibina y la disminución del título aglutinante del suero.
 - b) los glóbulos no intervienen en la reacción ni adsorben inhibina.
 - c) la inhibina no desaglutina los glóbulos aglutinados ni se fija a ellos.
 - d) el complemento no influye.
 - e) no se conserva efecto Janysz.
 - f) la inhibina queda en el sobrenadante, tanto en la zona de inhibición como en la zona donde hay aglutinación.
 - g) la inhibina manifiesta especificidades A y B.

- 3)- La sustancia inhibina se comporta de la siguiente manera:
 - a) es termoestable; resiste el calentamiento a 100 grados ^{en solución acuosa} centígrados/ y a 55° C. en solución etérea 75%.
 - b) no precipita por acción de los ácidos tricloroacético ni pícrico.
 - c) precipita por acción del ácido fosfotúngstico, del aceta-

to básico de plomo en solución alcohólica, se separa de la solución saturada con sulfato de amonio, precipita por adición de alumbre potásico.

- 4)- en todos los casos en que se comprobó poder inhibitorio, se constató la presencia de actividad biológica en el extracto, no habiéndose logrado la separación de ambos por ninguno de los métodos empleados.-

Olinda C. Derra
Agosto de 1952

VIII-BIBLIOGRAFIA

- 1- Boyd.-Fundamentals of Immunology.
- 2- Karl Landsteiner.-The specificity of serological reactions.
- 3- C. Rieington, S. J. Tillwell and K. Mansell.-Brit. J. Exp. Path.,
XVIII.3 9 (1947).
- 4- Morgan and King.-Biochem. J., 37, 640 (1943).
- 5- L. A. Binaghi.-Ann. Allergy, 8, 354-355 (1950).
- 6- C. Sutherland.-Brit. Med. J., 2, 280 (1942).
- 7- C. Rieington and K. Mansell.-International Archives of Allergy
and Applied Immunology, Vol. 1, Fase. 2.
- 8- C. Holzman, E. Bennett, B. Brown and C. Niemann.-Archives of
Biochemistry, 11, 415-432 (1946).
- 9- S. Stone, J. Harkavy and G. Brooks.- Ann. Allergy, 5, 546 (1947).
- 10- J. R. Spies, R. J. Coulson, H. S. Bernton and H. Stevens.-J. Am. Chem.
Soc., 62, 142 (1940).
- 11- A. Sons, C. Koch, R. S. Hirose.-Journal of Allergy, 3, 329 (1937).
- 12- L. A. Binaghi.-Proc. Int. Congr. Allerg., Zurich, 1951 (En prensa).
- 13- Samuel Feinberg.-Allergy in practice, 1946.
- 14- C. H. Boatner and B. C. Efron.-J. Investig. Dermat., 7 (1942).
- 15- S. Hampton, S. Dukantz and M. Johnson.-Acta Alergológica, 1, 229 (1945).
- 16- Samuel Milstein.-Tesis, Universidad Nacional de Buenos Aires,
Fac. C. R. F. y N., 1952.
- 17- A. S. Wiener.-Am. Journal of diseases of children, 71, 14 (1946).

INDICE

TITULO	PAGINA
I- Introducción	1
II-Objeto del presente trabajo	5
III-Parte experimental	6
1-Obtención del alergeno	6
2-Determinación de la inhibición de la agglutinación de glóbulos rojos	8
Error del método	13
IV- Mecanismo de la reacción	15
1-Estudio de la influencia de la cantidad de glób.	15
2-Relación entre suero e inhibina	17
3-Estudio de la influencia del complemento	19
4-Estudio de un posible efecto Danysz	27
5-Distribución de la inhibina en el sistema	22
A-En la zona de inhibición	24
B-En la zona donde hay aglutinación	27
6-Estudio de una posible reversibilidad de la aglutinación por la inhibina	29
7-La inhibina no se fija a los glóbulos aglutinados	30
8-Relación entre las aglutininas y la inhibina	31
V - Acción de agentes físicos y químicos sobre la inhib.	35
1-Deslentamiento en medio cetónico 75%	35
2-Tratamiento con ácido tricloroacético	36
3-Tratamiento con ácido pírico	40
4-Tratamiento con ácido fosfotúngstico	41
5-Tratamiento con alumbre potásico	43
6-Precipitación por sulfato de amonio	46

TITULO	PAGINA
7-Tratamiento con acetato básico de plomo	48
VI-Discusión	51
VII-Conclusiones	58
VIII-Bibliografía	60



Nota:

Este trabajo fué realizado en común con el señor Samuel Milstein, habiéndose dividido en dos:

- I) Estudio de la acción inhibitoria de los extractos alergénicos sobre la isoglutinación de glóbulos rojos humanos,
- II) Estudio de la acción inhibitoria de los extractos alergénicos sobre la isoglutinación de glóbulos rojos humanos. Posible método de ensaje de alérgenos (tesis a presentar por el Sr. S. Milstein), a los efectos de ajustarse a las disposiciones estatutarias vigentes en la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.