R .esp. Fisiol.
Tomo VII, núm. 1, páginas 7 a 15. 1951.

Departamento de Bioquímica del
Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Madrid

Aplicaciones de la polarografía al diagnóstico

III. — Mecanismo de producción de la onda polarográfica en sueros sanguíneos

por J. Lucas Gallego, A. Santos Ruiz y N. Jacob Ernst

(Recibido para publicar el día 25 de octubre de 1950

El problema que hemos abordado en esta tercera nota se refiere al mecanismo bioquímico de la producción de la onda polarográfica en los sueros desproteinizados y que tanta importancia tiene. En ella, vió Brdicka diferencias entre los sueros normales y patológicos, capaces de servir como base de reacciones de tipo diagnóstico, según referimos en nuestros dos trabajos anteriores (3 y 2).

Proseguimos aquí la labor con el fin de ver la influencia que pueden tener los compuestos sulfurados en la doble onda polarográfica de sueros sanguíneos.

Métodos

Hemos realizado experiencias con sueros naturales frescos y sueros incubados con o sin adición de sustancias químicas. Para estudiar la influencia de la adición de sustancias químicas, separamos el suero en dos fracciones, una como testigo y otra con adición de la sustancia sólida o disuelta, en cuyo caso se diluye la prueba testigo a igual concentración.

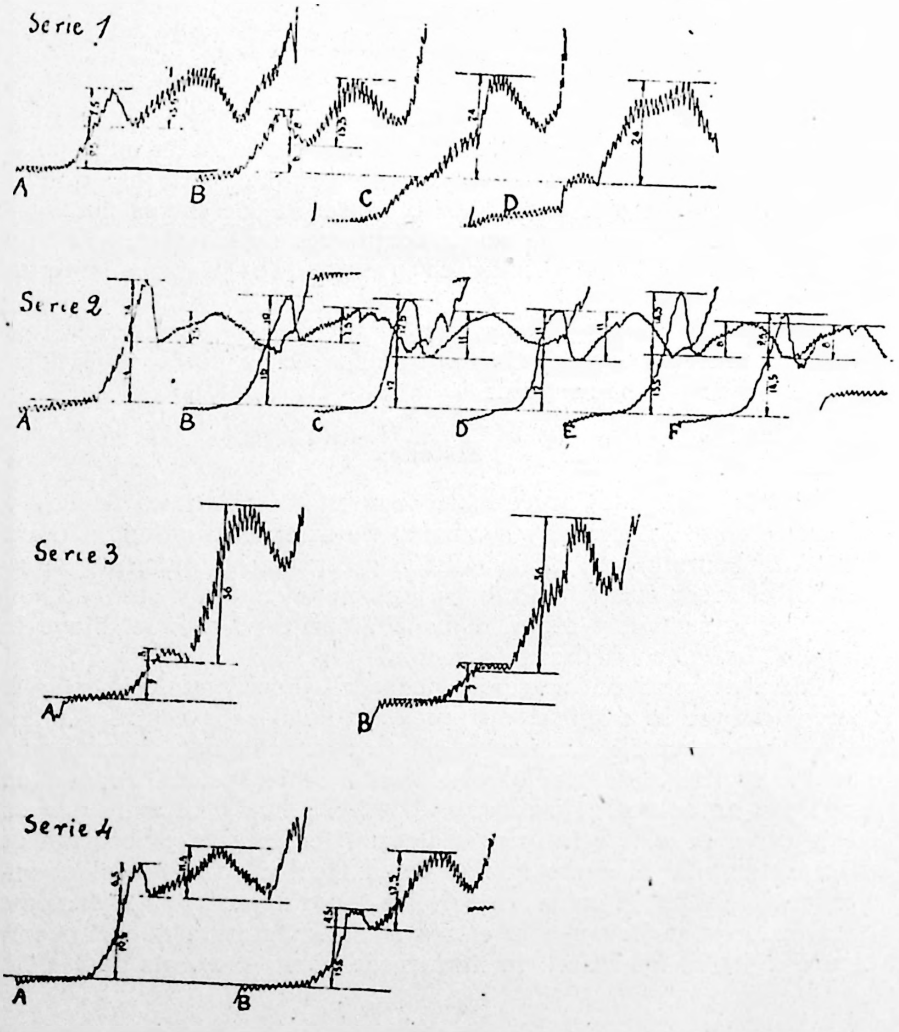
Para el estudio de sueros incubados procedemos a dividir el suero de que se dispone, en porciones iguales (la cantidad mínima debe de ser 1,5 c.c. por tubo). Se agrega entonces a cada uno de los sueros la sustancia, con la cual se les quiere incubar, en polvo o en solución fisiológica (o sencillamente en agua que en este caso, no ejerce influencia alguna) teniendo la precaución de diluir también el suero que se desea incubar solo. Se coloca entonces un algodón en la boca de los tubos de ensayo debidamente marcados y se llevan a la estufa a la temperatura de 37° o a la nevera según los casos, un número de horas que varía de 1 a 72.

Para desalbuminizar el suero se toman 0'4 c.c. de suero perfectamente centrifugados y se les agrega 1 c.c. de KOH N/10 y se deja durante 45 minutos al cabo de los cuales se agrega 1 c.c. de ácido sulfosalicílico al 20% y se filtra pasados 10 minutos por un filtro grueso. El líquido que pasa es el que nos sirve para las polarografías y que llamaremos «suero tratado».

Los resultados que incluímos a continuaciónn no recogen nada más que algunos que creemos más demostrativos. Las series completas de polarogramas logrados pueden verse en el trabajo de N. Jacob Ernst (1).

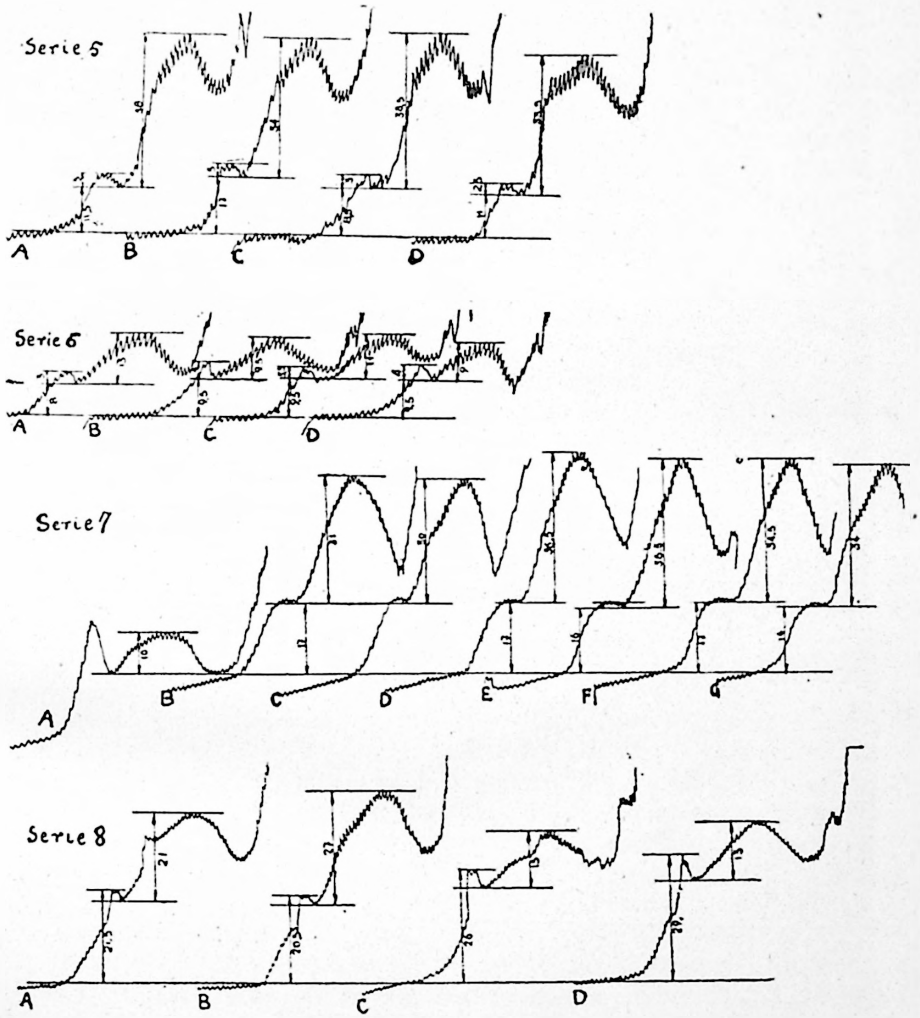
Resultados

Los diagramas A y B de la serie 1 corresponden a una sangre de sujeto normal, el A sin glutation y el B con glutation; los



polarogramas C y D son también de sangre normal, el C sin glutation y el D con glutation. En la primera sangre no se aprecia variación en la altura de la doble onda; en la segunda tampoco existe variación.

En los diagramas A, C y E de sangre sin cistina y en los B, D

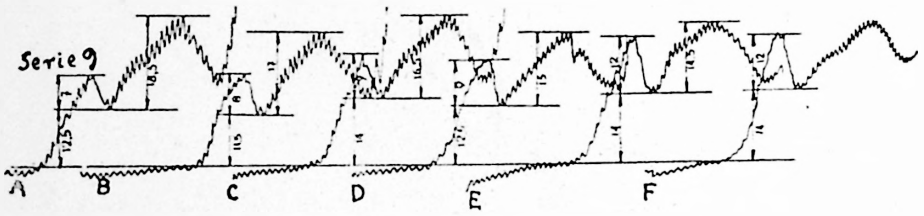


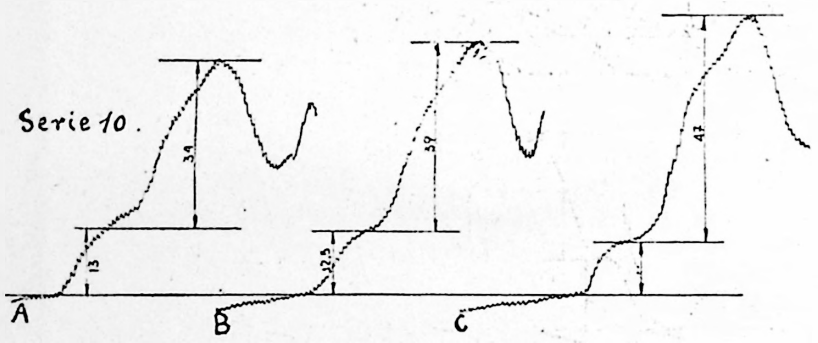
y F de las mismas sangres normales respectivamente con cistina, de la serie 2, no hay variaciones en la altura de la doble onda.

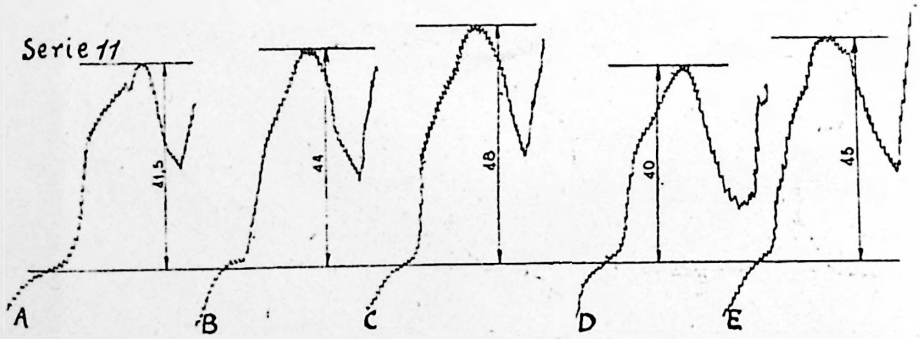
Asimismo en los polarogramas A y B de la serie 3 de una sangre de canceroso con y sin glutation respectivamente, tampoco se aprecian variaciones ostensibles en la altura. En estos diagramas se observa que la altura del máximo de cobalto es más

baja en las experiencias con glutation y cistina. En las tres series citadas no se ha hecho incubación.

Los diagramas de la serie 4 corresponden a una sangre normal, el A sin glutation y el B con glutation previa incubación durante 20 horas en estufa a 37°. Como puede verse la altura de la doble onda es mayor en el diagrama B que en el A en tanto







que la altura del máximo es menor en aquél que es éste. En igual forma se comporta la sangre de los diagramas A y B, C y D de la serie 5 y los A, B, C y D de la serie 6; el B y D de ambas series sin glutation y el A y C con glutation.

En la serie 7 el diagrama A corresponde a un suero sanguíneo de sujeto normal y los restantes a sueros patológicos. Los B y C de enfermo tuberculoso activo sin incubación; el B sin glutation

y el C con glutation. El D y el E corresponde al mismo enfermo con incubación de 20 horas y el F y el G a un enfermo de cáncer en las mismas condiciones. Se aprecia que las alturas de la doble onda son prácticamente iguales en los sueros patológicos con y sin glutation tanto en fresco como incubados.

En la serie 8, los diagramas A y B corresponden a una sangre normal, incubada 48 horas, el A sin glutation y el B con glutation. Los C y D corresponden a un suero de enfermo de cáncer sin y con glutation, también con 48 horas de incubación. Como se ve en el suero normal la altura de la doble onda aumenta después de la incubación con glutation, en tanto que en el suero de canceroso no hay variación en la altura.

En la serie 9 los diagramas A, C y E corresponden a sueros de luéticos sin adición de glutation y los B, D y F a los mismos sueros respectivamente con adición de glutation. Unos y otros incubados durante veinte horas. En ellos puede observarse que las alturas de la doble onda son aproximadamente iguales.

La serie 10 corresponde a un suero normal incubado durante veinte horas en nevera a 0°; el diagrama A de control, el B con adición de glutation y el C con cistina. En la serie 11 el mismo suero anterior es incubado en estufa a 37° durante veinte horas; el diagrama A control, el B con glutation y el C con cistina. Como se observa por comparación de estas dos series, las curvas a 37° son más altas que a 0° y cuando se adiciona cistina la altura de las curvas es mayor que con glutation.

Discusión

En los experimentos con sueros sanguíneos debemos tener en cuenta dos factores en la curva cuyo significado bioquímico es muy distinto; el primero es la doble onda proteínica que viene a reemplazar el escalón prenatrium, y cuyo origen ha dado base a las diversas interpretaciones que indicamos en nuestra comunicación anterior, y el segundo, se refiere a las modificaciones que sufre el máximo del cobalto, equivalente a las que estudiamos en los sueros artificiales.

La acción química del glutation y de la cistina como tales productos químicos no modifica la altura, colocación, ni forma de la doble onda, este hecho queda patente por lo siguiente:

a) Polarografiando simultáneamente dos fracciones de un suero, el uno adicionado de glutation o cistina y el otro como testigo, las alturas han sido siempre idénticas tanto en sueros normales como patológicos.

b) El análisis del glutation total de un suero, comparado con la altura de su polarograma no han mostrado paralelismo, por lo cual se esclarece, que con sales cobálticas se elimina la influencia

de estos péptidos en la altura de la doble onda. Como era de esperar de lo que se deducía del estudio de los sueros artificiales.

Las curvas de los sueros normales han sido en su mayoría bajas así como las de los cancerosos tratados con éxito, frente a las de cancerosos en evolución que han sido altas, y las de los tuberculosos con lesiones en actividad que han rebasado aún a las precedentes; los tuberculosos con procesos benignos o en la fase de curación han dado lugar a curvas de tipo normal. Todos estos hechos son debidos probablemente a que en los antes citados procesos patológicos, aparecen en el torrente circulatorio proteidos extraños, que no son los normales de la sangre y que son desintegrados por fermentos que Abderhalden cataloga bajo el título general de defensivos. Corrobora este aserto diversas circunstancias que ponemos de relieve en el transcurso de nuestro trabajo tales como el incremento, con el tiempo, de la altura de la doble onda en que se deja el suero antes de polarografiarlo; esta onda es la de un líquido desproteinizado por el ácido sulfosalicílico que contiene preferentemente sales inorgánicas, péptidos sencillos y aminoácidos. Como los primeros y los últimos productos quedan descartados no es aventurado suponer que es debida al aumento de estos péptidos de lisis proteínica, la elevación de la curva.

Sobre que el agente causal del fenómeno es enzimático, no parece caber duda, pues en los experimentos en que se dejan los sueros a temperaturas de 37° y 0°, siendo la primera, óptima para este tipo de proceso fermentativo «in vivo» e «in vitro» y la segunda inapropiada, las ondas que se consiguen en el primer caso, son más altas que las del segundo, lo cual indica una mayor proteolisis.

En los sueros normales existen proteidasas responsables de estos fenómenos autolíticos que aseguran el desdoblamiento proteídico normal que sirven a los efectos de la transpeptidizacion o o sea, reemplazamiento de péptidos antiguos por nuevos y por fin para desembarazar al organismo de células muertas. En los sueros patológicos, a estos fermentos, se agregan una gran cantidad de enzimas defensivas específicas de las albúminas extrañas que aparecen en el torrente circulatorio, por lo que las curvas que éstos producen son mucho más altas y también se incrementan relativamente menos «in vitro». Tanto los sueros normales como los patológicos llegan a producir una altura límite que podría representar el fin de la actividad hidrolítica enzimática.

Nuestros experimentos de incubación con adición de glutation o cistina son interesantes, ya que una vez descartada su influencia química, el método polarográfico es particularmente apropiado para medir la posible acción activadora de los fermentos de dichos prótidos. Bien sabido es en efecto, que éstos deben el citado efecto a sus grupos -SH.

Según se trate de sueros procedentes de normales o de cancerosos o tuberculosos y luéticos, se aprecia un comportamiento muy distinto. En los primeros, el efecto general del glutation o cistina es acelerador de la proteolisis, empieza por lo menos una hora después de estar en contacto con el suero, y transcurridas un número variable de horas, de 48 a 70, la acción enzimática se inhibe, probablemente por la proteolisis total, o bien por destrucción del glutation. En los casos patológicos, el comportamiento era diferente, ya que la curva del suero incubado con glutation solo, en contadísimos casos rebasaba la curva testigo, siendo en la generalidad de altura inferior; en todas las pruebas se vió una progresión de la proteolisis con el tiempo aunque más lenta que en los normales.

Para explicar este fenómeno admitimos tres posibilidades:

a) El glutation no activa las proteidasas defensivas de tipo patológico, y sólo se aprecia el efecto inhibidor de éste sobre la altura de la doble onda, por lo que ésta aparece generalmente más baja que la correspondiente al testigo.

b) El glutation sería también destruído, por lo cual no actuaría.

c) Cabe por fin que el glutation active realmente los fermentos hidrolíticos y que como la mayor parte de la proteolisis se hubiese realizado «in vivo», en los sueros patológicos su actuación «in vitro» fuese de menor duración; una vez que la proteolisis no pudiese ser activada por falta de elementos, el glutation intervendría inhibiendo la curva tanto más, cuanto menos acción hubiese tenido en la fase anterior.

El máximo que aparece en la solución fundamental sola, y cuya interpretación electroquímica no está todavía esclarecida, sufre en presencia de los sueros naturales modificaciones que destacamos a lo largo de nuestras experiencias. Primeramente parece que en los sueros normales éste no queda totalmente amortiguado, aunque redondeado conservando su típica forma de máximo; en los sueros patológicos en cambio, el amortiguamiento suele ser mucho mayor tanto más cuanto más alta sea la doble onda proteídica, y en los tuberculosos con curvas muy altas, éste desaparece totalmente quedando sustituído por un escalón. Es sabido que muchas sustancias, electrocapilarmente activas, o de tipo coloidal tienen acción de menguar estos máximos y nosotros comprobamos en los sueros artificiales el efecto del glutation y cistina como amortiguadores.

En los sueros naturales estos cuerpos, a la vez que otros péptidos sencillos, intervienen en la inhibición del máximo ya que sueros adicionados de estos péptidos y polarografiados al instante, resultan tener un máximo más amortiguado que los correspondientes testigos. En los experimentos de incubación también se

origina tal fenómeno, apareciendo el máximo en los polarogramas de sueros adicionados de glutation mucho más reducido, e incluso eliminado frente a los correspondiente testigos. Esta reducción del máximo puede por lo tanto explicar dos hechos que serían : mayor cantidad de productos de proteolisis en los sueros patológicos, y la intervención del glutation y cistina.

Conclusiones

1. — En los sueros naturales, el glutation y la cistina no influyen en la altura de la doble onda típica, sea el suero normal o patológico.

2. — La altura de la doble onda en todas las pruebas aumenta con el tiempo y en proporción directa con la proteolisis hasta cierto límite en que la liberación de grupos polarográficamente activos cesa.

3. — La acción proteolítica es debida a fermentos y es mucho mayor a 37° que a 0°, aunque a esta última temperatura aquéllos no se inhiben totalmente.

4. — El glutation y la cistina activan las enzimas proteolíticas en el suero normal y aceleran la liberación de los grupos polarográficamente activos; termina ésta generalmente a partir de las 48 horas.

5. — En los sueros patológicos la acción del glutation tiene un primer efecto activante, de corta duración, ya que a las veinte horas se asiste a una inhibición de la altura debida a este compuesto y a una inversión con relación a los normales.

6. — La acción de la cistina es siempre mayor que la del glutation en las condiciones de nuestros experimentos.

7. — El máximo de la solución fundamental está tanto más amortiguado cuando más alta es la curva y puede llegar a desaparecer en las curvas correspondientes a los sueros muy proteolizados o por adición de compuestos del tipo de la cistina y del glutation.

Summary

The blood serums, either normal or pathological, addition of glutathione and cystine have no influence en the height of the typical double wave.

In all tests the height of the double wave increaeses as time goes on and proprotionally with proteolysis up to a certain limit, in which the liberation of polarographically active groups ceases. These groups are neither glutathione nor cystine but must be peptsydes not precipitable through sulphosalicile acid.

The proteolytic action is due to ferments and is much greater at 37° C than at 0° C, althgough at this latter temperature the former are not totally inhibited.

This action is devedoped in normal as well as in pathological serums and can be measured with the technique employed.

In pathological serums the action of glutathione has a primary accelerating affect

and accelerate the liberation of polarographically active groups ending generally after 48 hours.

In pathological serums the action of glutathione has a primary accelerating effect of short duration, as after 20 hours an inhibition of the height and an inversion in relation to simple serums is observed.

In the conditions of our experiments the action of cystine is always greater than that of glutathione.

The maximum of the fundamental solution is the less acused the higher the curve is, and may disappear in curves corresponding to intensely proteolized serums or by addition of compounds of the type of cystine or glutathione.

Bibliografía

(1) N. JACOB ERNST: *Acerca del mecanismo bioquímico de la producción de la onda polarográfica en sueros.* Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Madrid, 1948.

(2) N. JACOB ERNST, J. LUCAS GALLEGO y A. SANTOS RUIZ: *R. esp. Fisiol.* 6, 207. 1950.

(3) A. SANTOS RUIZ y J. LUCAS GALLEGO: *R. esp. Fisiol.* 1, 203. 1945.