

Departamento de Investigación del Hospital Municipal de Infecciosos
Sección de Inmunoquímica (J. Gras)
Barcelona

Curvas de electrotitulación de globulina gamma*

por
J. Gras y N. Tuset

Tiene un particular interés en la actualidad el estudio de las posibles variaciones cualitativas de la globulina gamma en diversos procesos patológicos. Igualmente ha adquirido renovado interés el estudio de las curvas de electrotitulación de diversas proteínas como contribución al conocimiento de sus características fisicoquímicas y estructurales (1). Por estas razones consideramos podría ser interesante el estudio de las curvas de electrotitulación de globulina gamma.

Hemos estudiado de momento cinco globulinas gamma procedentes de dos enfermos con cirrosis hepática, otra de una enferma afecta de reumatismo poliarticular agudo con concomitante hepatitis, la cuarta de una mezcla de plasmas normales y, finalmente, una procedente de suero de caballo. Las tres primeras y la última fueron obtenidas por precipitación con hiposulfito sódico al 30.5 %, filtración y ulterior diálisis frente a suero fisiológico (2). La normal procedente de los Laboratorios Grifols, fue obtenida por precipitación alcohólica, liofilizada y redisuelta en suero fisiológico en el momento de la determinación; en todas ellas se ha constatado su pureza electroforéticamente, obteniéndose un valor de 94 % o superior. La cantidad de globulina gamma titulada en cada caso ha oscilado alrededor de 100 mg. en un volumen total de 20 c.c.

* Comunicación 5-2 a las V Jornadas Bioquímicas Latinas, Barcelona, mayo, 1959.

Como punto isoiónico se ha tomado el pH inicial de estas soluciones, dado que la globulina gamma no es soluble en su totalidad en agua destilada. A pesar de observaciones a favor de la ventaja de utilizar cloruro potásico en vez de cloruro sódico en estas titulaciones, las hemos practicado en las soluciones de esta última, a la concentración de la solución salina habitual, para situarnos en condiciones fisiológicas. Las titulaciones se han efectuado con HCl $N/100$ y $NaOH$ $N/100$, esta última preparada con las condiciones de rigor para que esté exenta de CO_2 . La curva se ha obtenido por el sistema de adiciones intermitentes con agitación constante de 15 a 20 segundos antes de cada lectura. La determinación de pH se ha verificado con electrodo de vidrio utilizando el potenciómetro Radiometer, tipo PHM 22. La temperatura ha oscilado de 18 a 20°. Los límites de pH han sido 3.0 y 10.0, por considerar que en nuestras condiciones de trabajo, sobrepasar estos límites sería introducir errores apreciables. En cada titulación se ha hecho paralelamente la curva blanco con solución salina.

Las curvas obtenidas se presentan en las figs. 1, 2, 3, 4, y 5; los valores se expresan por g. de proteína y no por mol, ya que las globulinas gamma electroforéticas constituyen una familia de proteínas con pesos moleculares distintos. Todas las curvas pueden desglosarse con más o menos claridad en tres subcurvas. La primera que termina a pH 6.0-6.5, la segunda a pH 7.5 a 8.5 y la tercera cuyo límite final no se ha alcanzado. En la de la fig. 1 es en la que se observa con mayor claridad esta disociación en tres subcurvas y en la fig. 4 correspondiente a la globulina gamma normal es en la que se aprecian con menor claridad. Con la interpretación general que se da a estas curvas considerando conjuntamente los grupos dadores de protones con pH próximos, podría atribuirse la primera subcurva a la titulación final de los grupos carboxilos. La segunda a la de los grupos imidazólicos y α -amonium, y la tercera curva incompleta correspondería a los grupos ϵ -amonium de la lisina, a los de la guanidina, fenólicos y sulfhidrúlicos. Por lo tanto, las ligeras diferencias observadas en las mismas podrían quizás corresponder a diferencias en el número de dichos grupos, correspondientes a una posible modificación patológica cualitativa de las mismas, o al aumento de un componente determinado dentro del grupo de proteínas constituyentes de la globulina gamma.

Los valores obtenidos, aunque diferentes, están próximos a los dados por TANFORD (3) para la albúmina de buey. No obstante, no creemos posible de momento valorar en firme las pequeñas diferencias obtenidas, por los múltiples factores que

pueden influenciar dichas titulaciones y consideramos conveniente desarrollar un mayor número de ellas, tanto en globulinas gamma procedentes de sueros patológicos como de sueros normales.



Figura 1

Resumen

Se han estudiado tres curvas de electrotitulación de globulina gamma humana patológica, obtenida por precipitación con hiposulfito sódico y control electroforético. Una de globulina gamma humana normal obtenida por fraccionamiento alcohólico, y otra de globulina gamma de caballo separada por precipitación con hiposulfito sódico.

Estas curvas se han desarrollado en potenciómetros radiómetro y

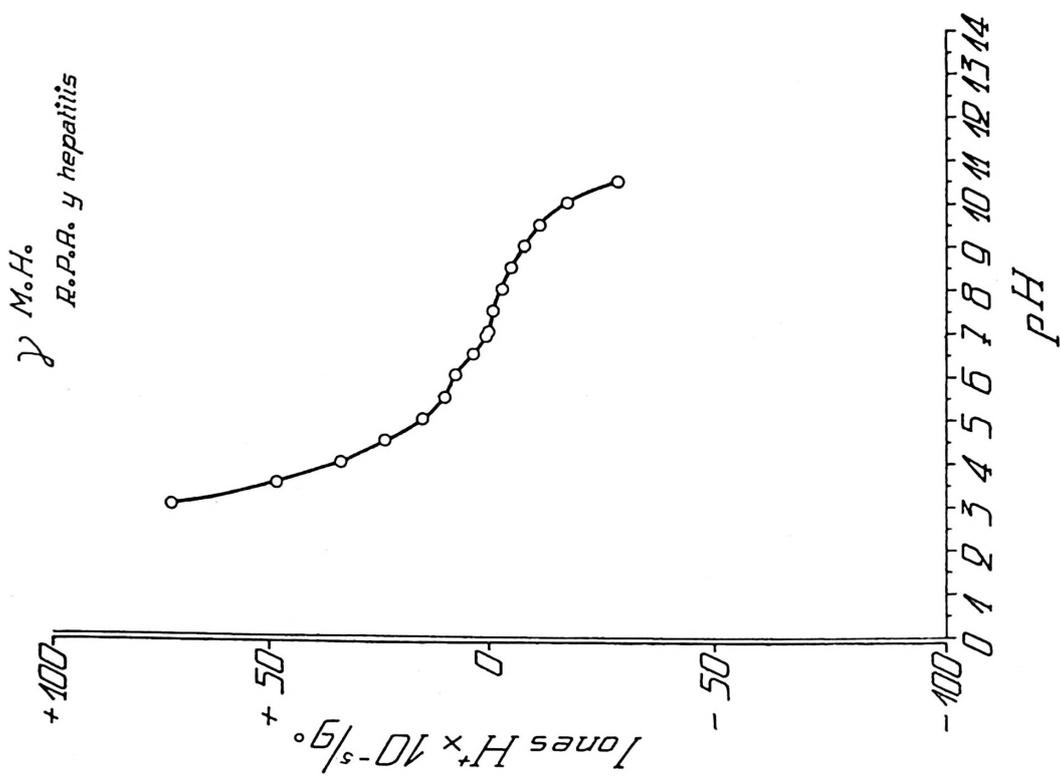


Figura 3

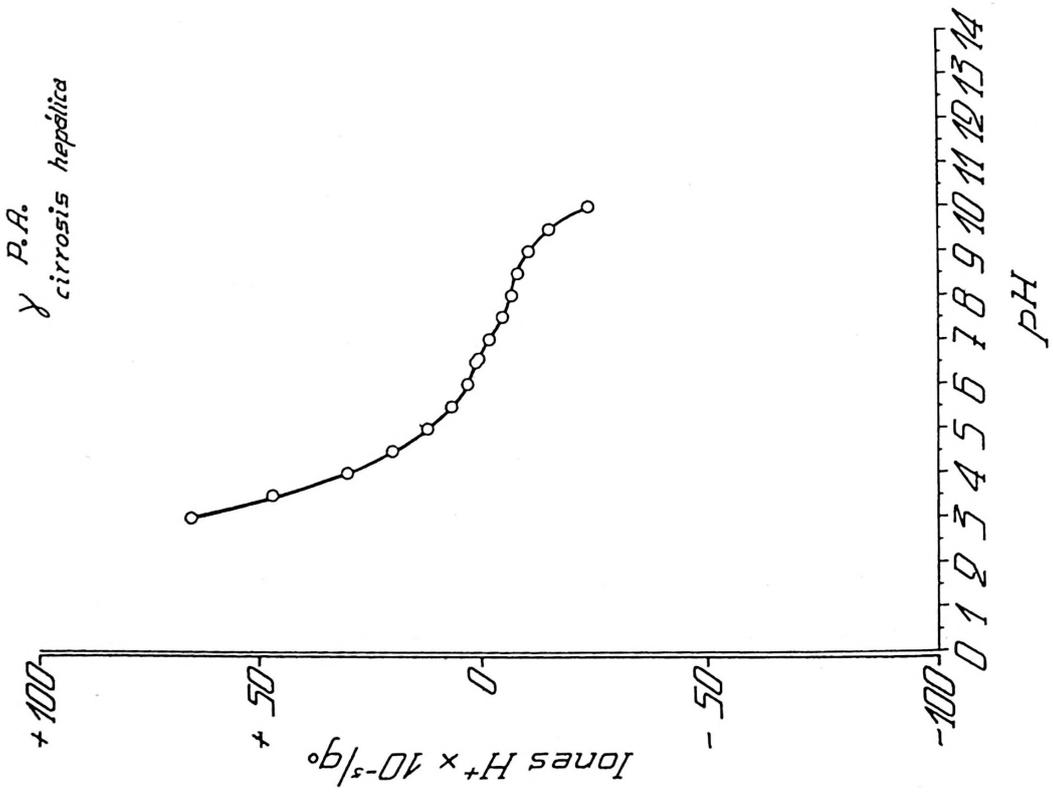


Figura 2

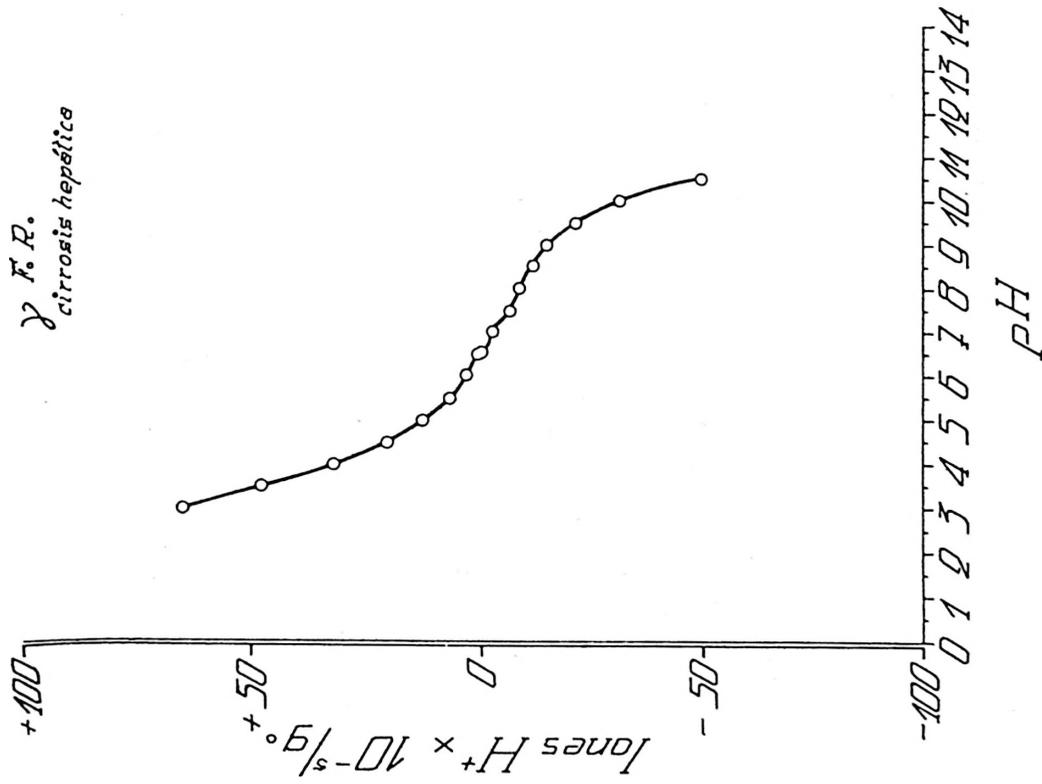


Figura 4

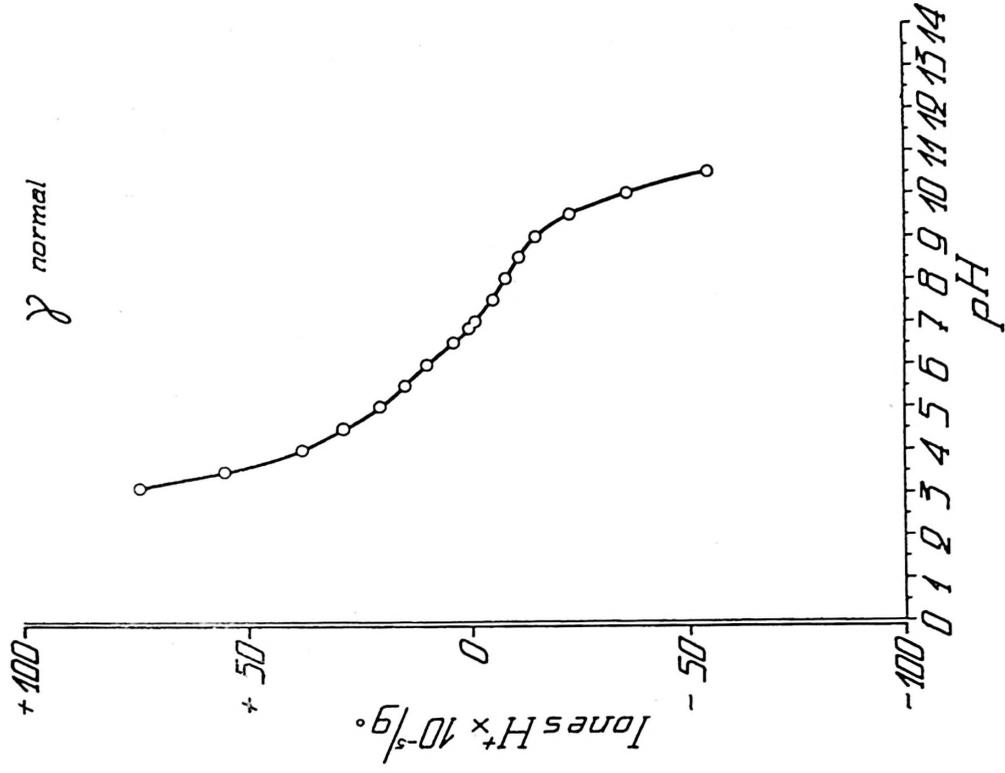


Figura 5

electrodo de vidrio, titulando con NaOH y ClH 0,01 N; se han iniciado tomando como punto O, los pH 6,43, 6,93 correspondientes a las soluciones de estas globulinas en suero fisiológico.

En todas ellas se insinúa un punto de inflexión alrededor de pH 6, que puede interpretarse como final de la titulación de los grupos carboxílicos, y otros alrededor de pH 9 a 9,5 que corresponde seguramente a los grupos amonio de la histidina y a los en posición *alfa*.

En zona alcalina todas las curvas son muy iguales, mientras que en zona ácida presentan netas diferencias en cuanto a la intensidad de caída, si bien, de momento, no se puede determinar si son debidas a la naturaleza patológica de estas globulinas gamma o a diferencias inobservadas en las condiciones de obtención o de diálisis de las mismas.

Summary

Gamma globulin electrotitration curves

Three electrotitration curves of pathologic human gamma globulin have been studied, obtained by precipitation with sodium hyposulfite and electrophoretic control. A normal gamma globulin curve obtained by alcoholic fractioning, and another from gamma globulin obtained from the horse by precipitation with sodium hyposulfite have also been studied.

These curves have been developed in radio potentiometers and glass electrode, titrating with NaOH and ClH 0,01 N; and have been started taking as 0, pH 6,43 and 6,93 corresponding to the dilutions of these globulins in normal saline solution.

In all of them a point of inflection insinuates around pH 6, which can be interpreted as the end of the titration of the carboxylic groups, and others around pH 9 to 9,5 which probably correspond to the ammonium groups of histidine and to those in the alpha position.

In the alkaline zone all the curves are very similar, while in the acid zone they present clear differences as to the intensity of decline, although, for the time being, it can not be determined if they are due to the pathologic nature of these gamma globulins or to differences not observed in the conditions of their obtainance or of dialysis of the same.

Bibliografía

- (1) EDSALL, J. T. : *Aspects actuels de la biochimie des acides aminés et des protéines. Actualités Biochim.* Masson, Ed. Paris 1958.
- (2) GRAS, J. y SALAZAR, M. : *Plasma* 2, 1, 1954.
- (3) TANFORD, CH. : *Hydrogen ion Titration curves of proteins. Electrochemistry in Biology and Medicine.* John Wiley & Sons, Inc., New York, 1955.