REVISTA ESPAÑOLA DE FISIOLOGIA
R. esp. Fisiol., 16, n.º 4, págs. 277-288

Laboratorio de Biología. Facultad de Ciencias
Universidad de Valladolid

Estudios con Fe^{59} sobre el transporte del hierro sérico en las aves

por

José Planas y Sisinio de Castro

(Recibido para publicar el 31 de octubre de 1960)

En comunicaciones anteriores (8, 9, 10) hemos referido nuestras observaciones sobre el nivel del hierro sérico y su mecanismo de transporte en las aves.

Habíamos observado que durante la puesta al ascender considerablemente la sideremia no lo hacía simultáneamente la capacidad total del suero para fijar hierro, determinada esta última por la técnica de RAMSAY (11). Consiste esta técnica en añadir hierro en exceso al suero con el fin de que la siderofilina se cargue completamente y eliminar el exceso con CO_3Mg. En vista de estos hechos pensamos que en las aves en puesta o bien además de la siderofilina interviene en el transporte del hierro sérico otras fracciones proteicas, o bien la siderofilina transporta una parte de hierro menos sólidamente fijada que en los mamíferos. Con el fin de aclarar estos extremos emprendimos las investigaciones objeto de este trabajo.

Los estudios llevados a cabo con Fe^{59} para explorar el metabolismo de este metal en las aves tratan de la distribución del Fe^{59} introducido en vena (2, 6) o bien de su captación *in vitro* por los reticulocitos para la síntesis de hemoglobina (5). Sin embargo, ninguno de ellos da detalles sobre el mecanismo de transporte en el suero.

Material y métodos

Las especies de aves utilizadas en nuestro estudio han sido *Gallus domesticus,* 3 gallinas y un gallo, de un peso aproximado de 1 kg; y *Anas platyrhynca,* variedad *Kaki-Campbell,* 3 hembras de 1,5 kg peso.

El hierro radioactivo procede del Radiochemical Centre, Amersham (Inglaterra), estaba en forma de citrato férrico en solución salina isotónica (actividad 55μ c. en 9,2μ g de Fe elemento disueltos en 2,3 c. c.).

Para los estudios *in vitro* se ha añadido al suero directamente la cantidad deseada de Fe^{59} en tubo de ensayo.

Para los estudios *in vivo* hemos obtenido suero del mismo ejemplar cuando ha sido posible, y se ha adicionado al mismo el Fe^{59}. A los 15 minutos de incubación, cuando se había fijado en las proteínas, se ha introducido por vía endovenosa. Se utiliza la vena del ala en las punciones venosas, tanto para la inyección del Fe^{59} como para las extracciones de sangre.

Las muestras de suero obtenidas dejando coagular espontáneamente la sangre, han sido sometidas inmediatamente a un análisis electroforético en papel.

Las tiras de los electroforegramas, una vez secas, han sido puestas en contacto con placas fotográficas para uso radiológico durante un tiempo variable de 1 a 6 días.

También varias tiras de electroforesis han sido sometidas al análisis de radioactividad con un contador Geiger, obteniéndose las curvas correspondientes.

El contenido en hierro de los sueros, así como las capacidades totales de fijación del hierro de los mismos, han sido determinadas según las técnicas de RAMSAY (12, 11).

Resultados

A. RESULTADOS «IN VITRO».

Pata 1 (no en puesta): 1 c. c. suero + 2 γ Fe^{59} (12 μ c).

La radioactividad aparece exclusivamente sobre las β-globulinas (Fig. 1c).

Pata 3 (en puesta): Sideremia: 1000 γ Fe %, y capacidad total de fijación: 504 γ Fe %.

0,5 c. c. suero + 0,4 γ Fe^{59} (2,4 μ c).

La radioactividad aparece concentrada selectivamente al nivel de las β-globulinas (Fig. 1b; fig. 3).

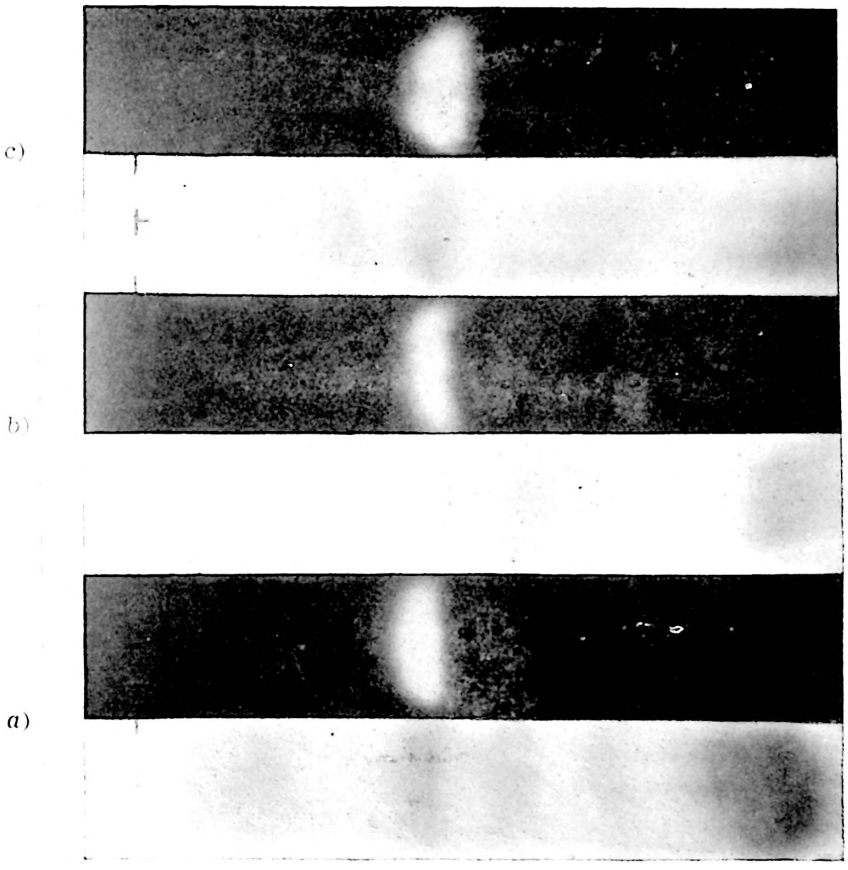

Figura 1
Bandas electroforéticas y autorradiografías correspondientes a los sueros: *a*) humano; *b*) pata 3; y *c*) pata 1.

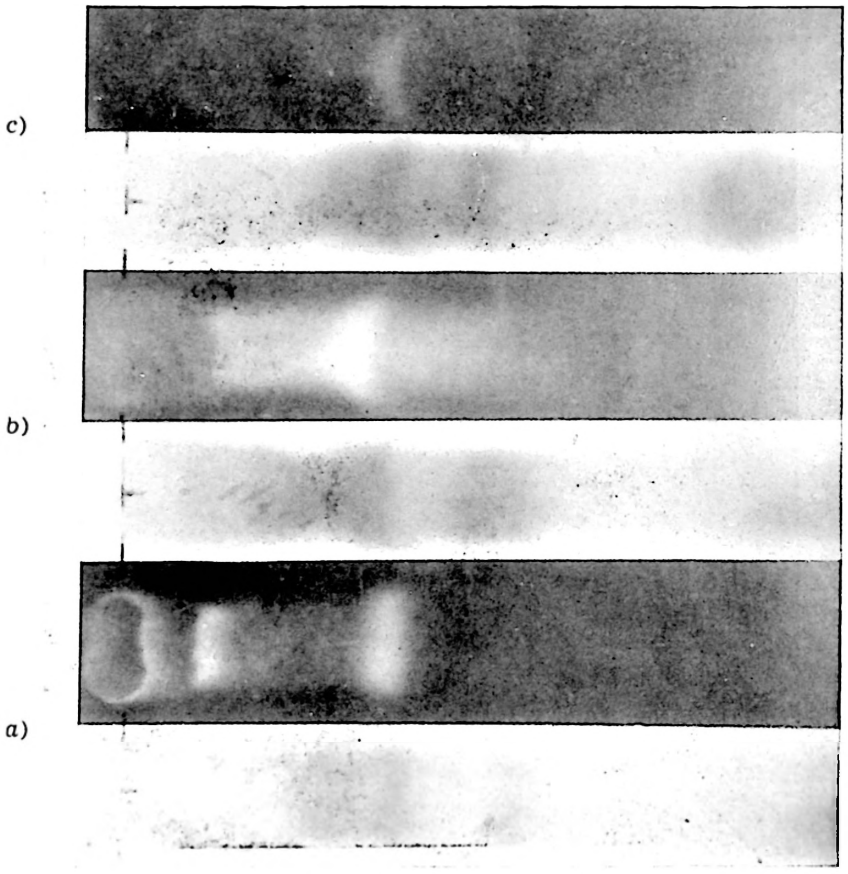

Figura 2

Bandas electroforéticas y sus correspondientes autorradiografías de los sueros: *a*) pollo; *b*) gallina II; y *c*) gallina III.

Gallina II (en puesta). Sideremia : 375 γ Fe %, capacidad total de fijación : 300 γ Fe %.

2 c. c. suero + 2 γ Fe^{59} (12 μ c).

La radioactividad aparece sobre todas las globulinas, pero es especialmente intensa sobre las β (Fig. 2b ; fig. 4).

Pollo. Sideremia : 130 γ Fe %, y capacidad total de fijación : 135 γ Fe %.

1 c. c. suero + 0,4 γ Fe^{59} (2,4 μ c).

La radioactividad aparece sobre todas las globulinas, pero es especialmente intensa sobre las β-globulinas (Fig. 2a ; fig. 5).

Suero humano. Sideremia : 35 γ Fe % y capacidad total fijación : 465 γ Fe %.

0,5 c. c. suero + 0,4 γ Fe^{59} (2,4 μ c).

La radioactividad aparece solamente sobre las β-globulinas (Fig. 1a).

B. Ensayos «in vivo».

Pata 1 (en puesta) : peso : 1,680 kg.

Inyección de 0,9 γ Fe^{59} (5,4 μ c). Toma de sangre a las 2 horas. No aparece radioactividad ninguna sobre las proteínas plasmáticas separadas electroforéticamente.

Pata 2 (no en puesta) ; peso : 1,590 kg.

Inyección de 2 γ Fe^{59} (12 μ c). Extracción de sangre a los 20 minutos y a las 24 horas.

No es detectable radioactividad en ninguna de las muestras de suero sometidas a electroforesis.

Gallina I (en puesta) :

Inyección de 0,8 γ Fe^{59} (4,8 μ c). Extracción de sangre a las 3 y 21 horas.

No es detectable radioactividad en las correspondientes proteínas plasmáticas.

Gallina II (en puesta) :

Sideremia : 375 γ Fe %, y capacidad total de fijación : 300 γ Fe %.

Administración por vía oral de 0,8 γ Fe^{59} (4,8 μ c). Extracción de sangre a las 3 y 21 horas.

No se detecta radioactividad en las proteínas plasmáticas.

Gallina III (en puesta) :

Sideremia : 450 γ Fe % y capacidad total de fijación : 250 γ Fe %.

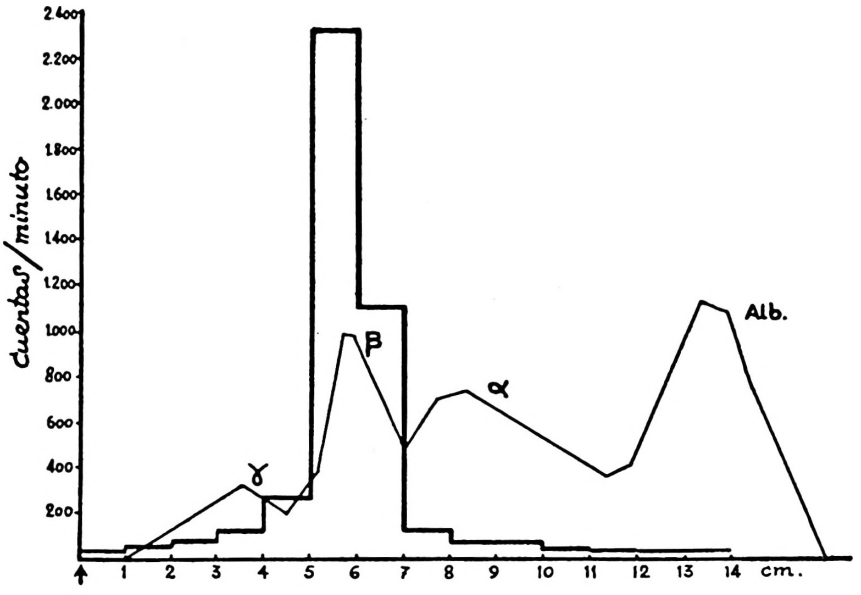

Figura 3
Distribución de la radioactividad del Fe^{59} medida con contador Geiger sobre la banda electroforética del suero correspondiente a la pata 3. El Fe^{59} se concentra sobre la fracción β-globulina.

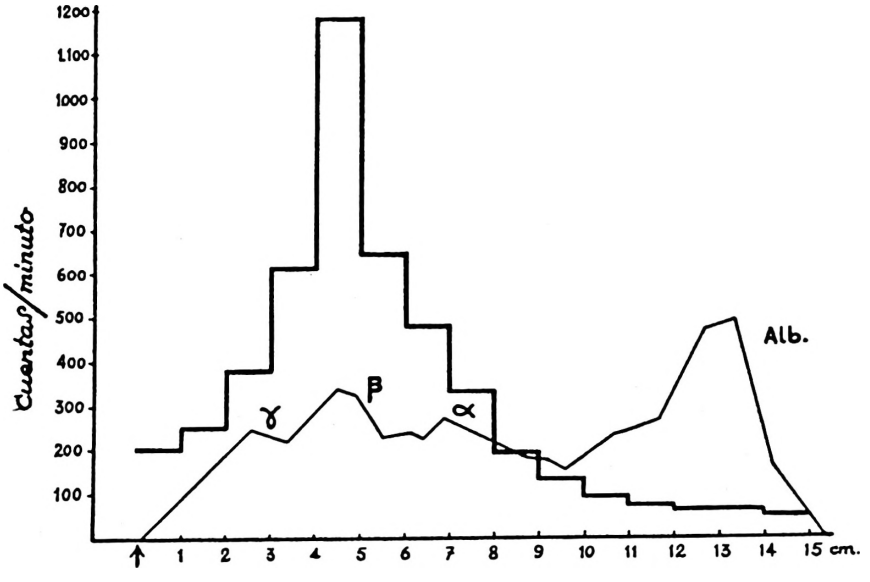

Figura 4
Distribución del Fe^{59} medido con contador Geiger sobre el electroforegrama del suero de la gallina II. El Fe^{59} aparece sobre todas las globulinas, pero su máxima intensidad corresponde a las β.

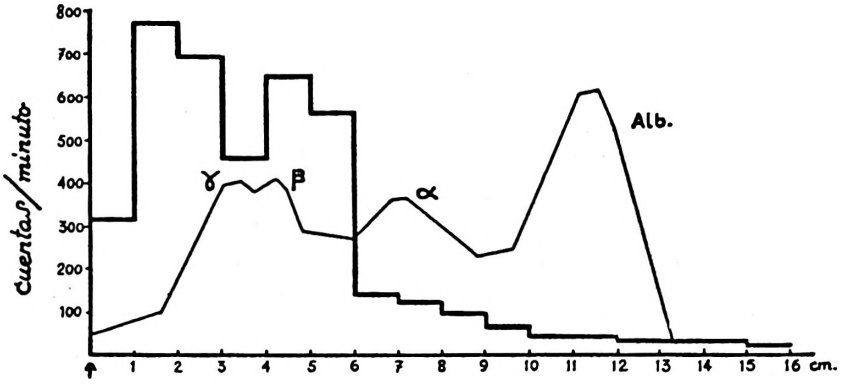

Figura 5
Localización con el contador Geiger del hierro radioactivo sobre el electroforegrama del suero de pollo. El Fe^{59} se encuentra especialmente al nivel de las γ y β-globulinas.

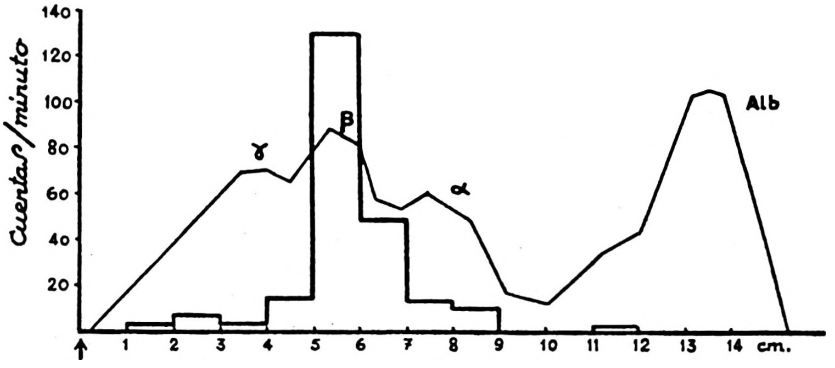

Figura 6
Radioactividad (Fe^{59}) medida con contador Geiger sobre el electroforegrama del suero de la gallina III. Se aprecia que aquélla está situada al nivel de las β-globulinas. Obsérvese la poca intensidad alcanzada en este ensayo «in vivo» en comparación de los efectuados «in vitro».

Inyección de 2 γ Fe^{59} (12 μ c). Extracción de sangre a los 5 minutos.

Aparece radioactividad exclusivamente sobre las β-globulinas (Fig. 2c; fig. 6).

Nueva extracción a las 24 horas, con resultado negativo.

Discusión

Al examinar los resultados llama la atención que en los ensayos *in vitro* discrepa el comportamiento de las patas del

de las gallinas. Pues en las primeras la radioactividad aparece exclusivamente sobre las β-globulinas (fig. 1b y 1c; fig. 3), estén o no en puesta, o lo que es lo mismo, supere o no la sideremia a la capacidad total de fijación determinada por el método de RAMSAY. Por el contrario, en la gallina II (fig. 2b; fig. 4) y lo mismo en el pollo (fig. 2a; fig. 5), si bien es cierto que en ambos casos la sideremia iguala o supera a la capacidad de fijación, la radioctividad aparece difundida sobre las globulinas, aunque siempre preferentemente sobre las β.

In vivo, en el único caso (gallina III) que hemos conseguido detectar radioactividad en el suero, estaba situada a nivel de las β-globulinas (fig. 2c; fig. 6).

Los estudios con autorradiografía llevados a cabo con sueros humanos (3, 4, 13) han demostrado que *in vivo* sólo aparece radioactividad sobre las β-globulinas, e *in vitro* lo mismo, en tanto la cantidad de Fe^{59} añadida no supere la capacidad de fijación del suero, pues cuando ésta es superada la radioactividad se dispone también sobre las demás fracciones globulínicas.

La figura (Fig. 1a) corresponde a un suero humano al que se añadió *in vitro* Fe^{59} sin superar la capacidad de fijación: por ello, la radioactividad aparece exclusivamente sobre las β-globulinas.

En las aves durante la puesta la sideremia supera constantemente a la capacidad total de fijación (9, 10). Si los sueros de estos animales se comportan como los humanos al añadirles Fe^{59} éste se dispondría sobre otras globulinas distintas de las β. Y no es este el caso, pues en las patas se dispone exclusivamente sobre las β-globulinas y en las gallinas (gallina II y pollo que por tener el mismo valor de sideremia y capacidad de fijación puede ser equiparado para nuestro objeto a las gallinas en puesta) se dispone en su mayor parte sobre las β-globulinas y el resto sobre otras globulinas (fig. 2a y 2b; fig. 4 y fig. 5).

Podemos concluir, pues que, como en el hombre, son las β-globulinas (una fracción de las mismas, la siderofilina) las encargadas del transporte del hierro sérico. En las patas exclusivamente aún durante la puesta, y en las gallinas sino exclusiva preferentemente, pues nuestros estudios demuestran que al menos *in vitro* otras proteínas son capaces de cargarse también con Fe^{59}. Estas fracciones proteicas podrían corresponder a la conalbúmina (7).

Ahora bien, necesariamente la fijación de parte del hierro a la siderofilina ha de ser distinta de la habitual. Pues normalmente el hierro transportado por la siderofilina no es adsor-

bible por el carbonato magnésico. Y por el contrario, en las aves en puesta estudiadas por nosotros, parte del hierro que los estudios que acabamos de referir demuestran que es transportado exclusiva o preferentemente por las β-globulinas, es arrastrado por el carbonato magnésico (9, 10).

Un hecho que ya al margen de nuestro objeto se desprende de ensayos *in vivo* es que el *turnover* del hierro plasmático en las aves en puesta es más rápido que en el hombre. Pues mientras en este último a los 20 minutos de la inyección intravenosa de Fe^{59}, éste es demostrable aún en el suero (1), en las aves (pata 1 y 2, gallina I) ya ha desaparecido en este momento del torrente circulatorio. Nos hemos visto obligados a extraer sangre a los 5 minutos de la inyección (utilizando una ala para la inyección y la otra para la extracción) para conseguir la demostración de la radioactividad en el suero. De todas formas, ya KLEIN (6) demostró que el *turnover* de hierro plasmático en el pato macho es 5,6 veces más activo que en el hombre.

Resumen

Con el fin de precisar el mecanismo de transporte del hiero sérico en las aves en puesta hemos realizado estudios con Fe^{59} en gallinas y patas en puesta, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Las proteínas de los sueros correspondientes han sido separadas mediante electroforesis en papel, sometiendo los electroforegramas obtenidos a un análisis autorradiográfico y a una exploración con un contador Geiger, con el fin de localizar la radioactividad.

Hemos observado que la radioactividad, en las patas, está situada constantemente a nivel de las β-globulinas, y en las gallinas *in vivo* también sobre las β-globulinas, e *in vitro* sobre todas las globulinas, aunque preferentemente sobre las primeras.

Estudios realizados en este laboratorio han demostrado que la adición de carbonato magnésico arrastra parte del hierro circulante. Este hierro, en las patas, hemos visto que va fijado exclusivamente a las β-globulinas, y en las gallinas en su mayor parte, ya que *in vitro* también se dispone sobre otras globulinas.

Necesariamente pues, parte del hierro, precisamente la que es arrastrada por el carbonato magnésico, ha de estar fijada a la β-globulina más lábilmente.

Agradecemos a don M. del Val Cob de la Sección de Isótopos de la Junta Energía Nuclear por su amable colaboración en la lectura de bandas electroforéticas con contador Geiger.

A don José M.ª Luelmo (Granja Minaya) y a don J. Anadon

(Prodes S. A., Retuerta) por su ayuda en proporcionarnos los animales de experimentación.

Summary

Studies with Fe^{59} on the serum iron transport in birds

In our previous works (8, 9, 10) we have showed that in laying birds the serum iron increases greatly thus surpassing the values of the total iron-binding capacity (TIBC), determinated by the RAMSAY'S method (11).

Others works done with Fe^{59} in birds (2, 5, 6) do not concern the transport mechanism.

We have studied the species : *Gallus domesticus* (3 females and 1 male) and *Anas platyrhynca,* var. *Kaki-Campbell* (3 females).

The radioactive iron had an activity of 55 μ c. in 9.2 μ g of iron element, as citrate, dissolved in 2.3 cc of isotonic solution.

For the studies *in vitro* the desired quantity of Fe^{59} has been added to the serum in a test tube. For the studies *in vivo* the Fe^{59} has been incubated with serum of the same specie for 15 minutes and afterwards injected in the vein.

Serum with Fe^{59} was subjected to paper-electrophoresis, and the paper strips were autoradiographied with an X-Ray film. In some strips the radioactivity has been measured with a Geiger counter.

Serum iron and TIBC have been determined following RAMSAY'S methods (12, 11).

The radioactivity in ducks is found exclusively upon the β-globulins (Fig. 1b and 1c ; Fig. 3). In hens and chicken *in vitro* the Fe^{59} is seen in all the globulins, but very specially in the β fraction (Fig. 2a, 2b ; Fig. 4 and Fig. 5). In the only case that we were able to find radioactivity in the serum after Fe^{59} injection (Hen n.° III : Fig. 2c and Fig. 6) the radioactivity was found upon the β-globulins.

Studies done in this laboratory shown that a part of the circulating iron is carried off by adding magnesium carbonate to the serum. This iron, as we have seen, is in ducks exclusively bound at the β-globulins. In hens, it is also bound in its great part to these globulins, as *in vitro* the iron can also be bound to other globulins.

A part of these iron, precisely the one which is carried off by the magnesium carbonate, must necesarily be bound to the β-globulins in a more labile form.

We have also been able to notice from our experiments *in vivo* that the turnover of the plasma iron in birds during the laying period is especially active.

Bibliografía

(1) FINCH, C. A.: *Eisenstoffwechsel*, p. 141. G. Thieme Verlag. Stuttgart, 1959.

(2) HALKETT, J. A. E., PETERS, T., and ROSS, J. F.: *J. Biol. Chem.*, **231**, 187, 1958.

(3) HORTS, W., und SCHAEFER, K. H.: *Klin. Wschr.*, **31**, 340, 1953.

(4) JASINSKI, B., und ROTH, O.: *Larvierte Eisenmagenkrankheit.* Benno Schwabe, Basel, 1954.

(5) JENSEN, W. N., ASHENBRUCKER, H., CARTWRIGHT, G. E.. and WINTROBE, M. M.: *J. Lab. Clin. Med.*, **42**, 833, 1953.

(6) KLEIN, J. R.: *Am. J. Physiol.*, **196**, 656, 1959.

(7) MARSHALL, M. E., and DEUTSCH, H. F.: *J. Biol. Chem.*, **189**, 1, 1951.

(8) PLANAS, J.: *R. esp. Fisiol.*, **16**, 33, 1960.

(9) PLANAS, J., y DE CASTRO, S.: *R. esp. Fisiol.*, **16**, 197, 1960.

(10) PLANAS, J., y RECIO, J. M.: *R. esp. Fisiol.*, **16**, 265, 1960.

(11) RAMSAY, W. N. M.: *Clin. Chim. Acta*, **2**, 221, 1957.

(12) RAMSAY, W. N. M.: *Clin. Chim. Acta*, **2**, 214, 1957.

(13) WALLENIUS, G.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **4**, 24, 1952.