

Laboratorio de Biología.—Facultad de Ciencias
Universidad de Valladolid

Las proteínas plasmáticas de la gallina

por
J. Planas y J. M. Recio

(Recibido para publicar el 7 de junio de 1961)

Las proteínas plasmáticas en esta especie han sido estudiadas por diferentes autores y siguiendo técnicas distintas. Así, han sido analizadas por medio de la electroforesis libre (3, 6), electroforesis en papel (1, 2, 4, 5, 7, 11), electroforesis en gel de agar (10) o por fraccionamiento salino con sulfato sódico (3).

De los diferentes trabajos publicados sobre este tema son de mayor interés aquellos que presentan una referencia exacta en cuanto a edad, sexo y estado sexual de los ejemplares examinados y que estudian la posible relación existente entre estos fenómenos y las proteínas plasmáticas. Todos estos datos deben ser ordenados y elaborados a fin de poder obtener alguna conclusión general, pues no ha sido realizada una labor de síntesis con las observaciones más recientes, después de la que puede hallarse en la obra de STURKIE (18). Por otra parte, este autor se preocupa solamente de la relación albumina/globulina y no entra en el detalle de las diferentes fracciones.

Nuestros estudios anteriores sobre el transporte del hierro por el suero y la globulina beta-1 fijadora del mismo (transferrina o siderofilina) en distintas aves (13, 14, 15, 16, 17) nos ha permitido apreciar cómo durante la puesta el transporte del hierro se encuentra notablemente aumentado. Nos ha parecido sumamente útil para nuestro trabajo el recopilar cuantos datos han podido recogerse sobre las fracciones proteicas en la especie *Gallus domesticus*, relacionadas con el sexo y distintos estados de madurez sexual, a fin de poder apreciar si existe alguna variación característica ligada a la puesta.

Para aportar nuevos datos sobre esta cuestión, nosotros hemos también efectuado fraccionamientos de sueros de diferentes ejemplares de esta especie, diferenciando sexos, y separando las hembras según su estado sexual. El fraccionamiento se ha realizado con hiposulfito sódico, adaptándose una técnica dispuesta para el suero humano.

Material y métodos

El material utilizado ha sido el suero obtenido por coagulación espontánea, y han sido eliminados aquellos sueros que fuesen ligeramente hemolizados. En varias ocasiones se han mezclado los sueros correspondientes al mismo lote. Los fraccionamientos se han realizado dentro de las 12 horas de la sangría.

La técnica de fraccionamiento salino utilizada ha sido la propuesta por GRAS y SALAZAR (8) para el suero humano con el empleo de hiposulfito sódico ($\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$) como agente precipitante. Ha sido preparada una solución madre de concentración aproximada de 50 g %, y valorada frente a una solución tipo de IO_3K . A partir de esta solución de concentración exactamente conocida se han obtenido por dilución las concentraciones de 20, 25 y la serie comprendida entre 30 y 50 g % con saltos de 1 g %. A fin de controlar estas diluciones, han sido nuevamente valoradas por iodometría.

Siguiendo las indicaciones de los autores (8) se ha utilizado un hiposulfito sódico de gran pureza, y la solución madre ha sido tratada con carbón activo.

La filtración en los fraccionamientos se ha efectuado con papel Albet n.º 240, siendo necesario repetir tres veces la operación a fin de obtener un líquido totalmente transparente.

En el filtrado se han determinado las proteínas mediante la reacción del biuret utilizando el reactivo de Weichselbaum. Las lecturas han sido realizadas en un fotocolorímetro Beckman modelo C, al cual se ha adaptado un galvanómetro de spot para ampliar su sensibilidad.

Los valores absolutos de proteínas han sido obtenidos gracias a una curva patrón preparada con diferentes diluciones de suero en las que han sido determinadas simultáneamente su contenido en nitrógeno (micro-kjeldahl) y su intensidad de color (biuret). También han sido determinadas las proteínas totales de distintos sueros de ambos sexos según procedimiento con micro-kjeldahl.

Se ha realizado un control electroforético de los precipitados gracias a una técnica de electroforesis en papel, utilizando

como electrolito veronal sódico (12 gr/litro; $pH = 8,8$), corriente 105 V. y duración 12-14 horas.

Resultados

Se han realizado fraccionamientos con hiposulfito sódico por separado de sueros correspondientes a machos y hembras, y dentro de estas últimas se ha hecho la distinción entre las en puesta y no en puesta. En la tabla I se expresan los resultados de algunos de estos fraccionamientos.

En las figuras 1, 2 y 3 pueden apreciarse las curvas de fraccionamiento salino correspondientes a sueros de los tres lotes considerados. El estudio comparativo de las curvas obtenidas con todos los fraccionamientos permite poner en evidencia unos

TABLA I

Fraccionamiento salino con hiposulfito sódico de algunos sueros de gallina

Na ₂ S ₂ O ₃ gr. %	Gallinas en puesta mg. proteínas del filtrado			Gallinas no en puesta mg. proteínas del filtrado			
	5 sueros	3 sueros	3 sueros	5 sueros	1 suero	1 suero	1 suero
20	5,30	—	—	3,90	—	—	—
25	4,87	—	—	3,50	—	—	—
30	4,15	3,25	3,35	3,35	2,80	2,80	3,25
31	4,20	3,25	3,35	3,35	2,70	2,70	3,25
32	4,20	3,25	3,25	3,25	2,80	2,60	2,60
33	4,20	3,00	3,25	3,25	2,60	2,60	2,60
34	3,80	3,00	3,00	2,95	2,60	2,60	2,60
35	3,90	3,00	3,00	2,95	2,60	2,30	2,60
36	3,80	2,95	3,00	2,95	2,60	2,40	2,45
37	3,80	2,95	2,85	2,95	2,60	2,30	2,45
38	3,55	2,80	2,65	2,70	2,50	2,30	2,30
39	3,65	2,70	2,65	2,70	2,45	2,10	2,30
40	3,60	2,70	2,65	2,60	2,20	1,95	2,30
41	3,65	2,45	2,50	2,60	2,20	1,95	2,15
42	3,30	2,45	2,50	2,45	2,10	1,95	2,00
43	3,30	2,35	2,45	2,45	2,10	1,80	1,95
44	3,25	2,10	2,20	2,45	2,10	1,80	1,75
45	3,15	2,10	2,15	2,20	1,95	1,70	1,75
46	2,70	2,10	1,95	2,20	1,95	1,70	1,60
47	2,60	1,75	1,95	2,20	1,80	1,70	1,60
48	2,25	1,70	1,80	2,20	1,80	—	1,60
49	2,30	1,60	1,75	1,90	—	—	—
50	2,25	—	—	1,90	—	—	—

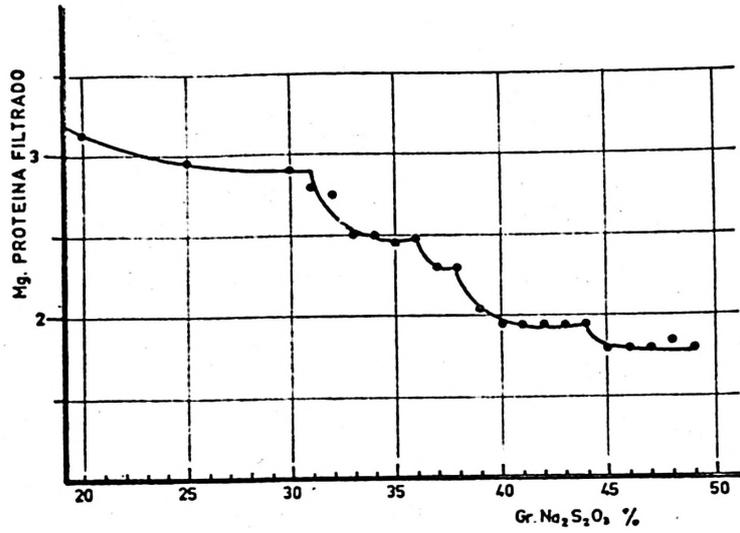


Figura 1. — Curva de fraccionamiento salino con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, obtenida con la mezcla de dos sueros de pollo.

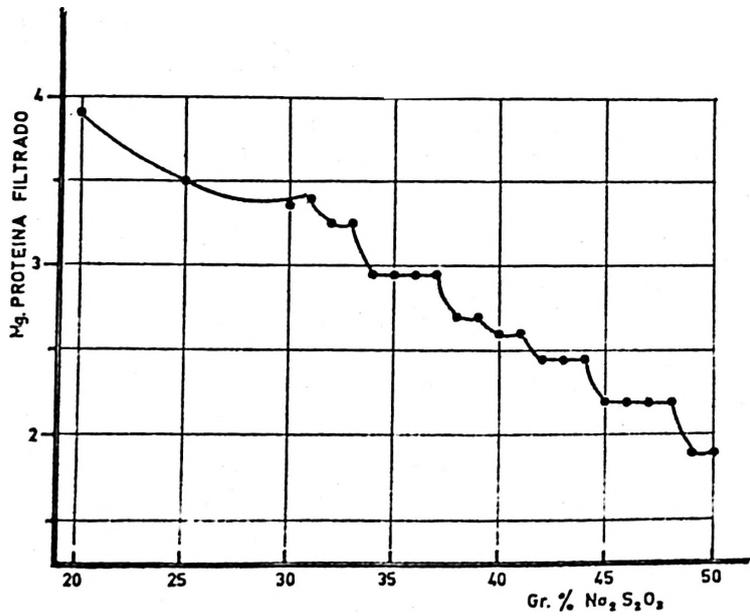


Figura 2. — Curva de fraccionamiento salino ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) obtenida con una mezcla de cinco sueros de gallinas no en puesta.

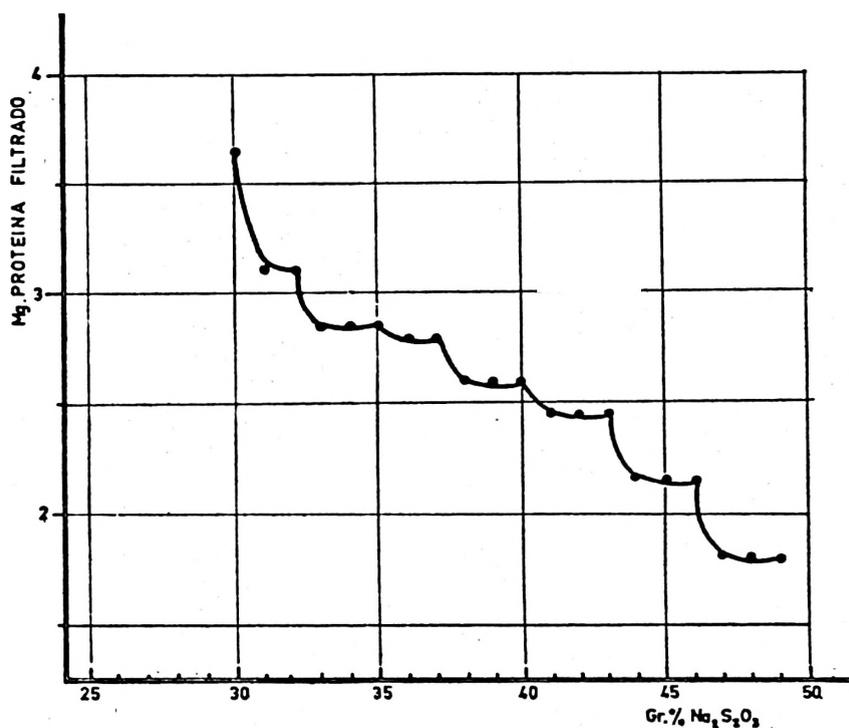


Figura 3. — Curva de fraccionamiento salino con hiposulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) de una mezcla de cuatro sueros pertenecientes a gallinas en puesta.

TABLA II

Valores medios y sus desviaciones standard de los porcentajes de las fracciones obtenidas con el $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Las cifras entre paréntesis corresponden al número de sueros empleados

Concentración $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gr. %	Machos (2)	Hembras	
		En puesta (14)	No en puesta (12)
32	29 %	21,9 ± 3,8	19,1 ± 3,6
34	20,6 %	24,6 ± 4	22,4 ± 7,5
37	13,9 %	16,7 ± 1,2	20,5 ± 2,9
40	20,7 %	14,9 ± 3,5	14,2 ± 4,5
44	7,7 %	11,6 ± 1,7	11,6 ± 3,4
47	7,8 %	10,5 ± 3,9	11,9 ± 3,8

TABLA III

Valores medios de proteinemia en *Gallus domesticus* obtenidos por distintos autores. Las cifras entre paréntesis indican el número de determinaciones realizadas

Autor y técnica utilizada. Cita bibliográfica	Machos	Proteinemia (gr. %)	
		Hembras no en puesta	Hembras en puesta
STURKIE y NEWMAN (19), biuret	4,00 (14)	5,34 (15)	4,75 (21)
BRANDT y colab. (3)	3,36 (5)	4,60 (10)	5,40 (9)
PLANAS y CASTRO (13), refractometría	4,14 (11)	5,11 (12)	6,56 (4)
PLANAS y RECIO, micro-kjendahl	3,34 (2)	3,90 (5)	5,31 (7)

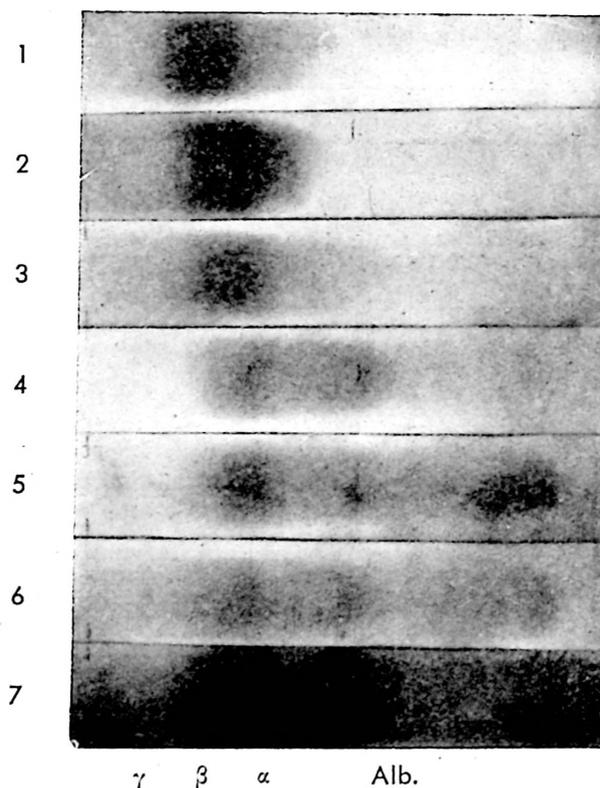


Figura 4. — Bandas electroforesis correspondientes a distintas fracciones obtenidas por fraccionamiento salino con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, en comparación con el suero total. Bandas: 1) concentración 28 gr. %; 2) 30 gr. %; 3) 34 gr. %; 4) 37 gr. %; 5) 44 gr. %; 6) 47 gr. %; y 7) suero.

puntos de inflexión que corresponden a las concentraciones de : 32, 34, 37, 40, 43-44 y 45-47 gr %.

Las fracciones que resultan de tales puntos se han expresado en tantos por ciento del valor global, y en la tabla II se indican sus valores medios junto con sus desviaciones standard

En la fig. 4 puede comprobarse los componentes proteicos que precipitan a las concentraciones de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ de 28, 30, 34, 37, 44 y 47 gr %, en comparación con el suero total, analizados con la técnica de electroforesis en papel.

Discusión

La concentración de proteínas plasmáticas presenta valores más bien bajos, como es general en las aves. Los diferentes datos en la bibliografía ponen de manifiesto una clara diferencia sexual por lo que respecta a la proteinemia, y los autores están de acuerdo en considerar que es inferior en los machos que en las hembras, y ha sido sugerida una posible intervención hormonal. Esta influencia hormonal queda confirmada al inyectar estrógenos a hembras inmaduras (12). También ha sido señalado un aumento de las proteínas totales con la edad. No existe, por el contrario, una uniformidad de criterio en cuanto a la diferencia entre las hembras en puesta o no en puesta, pues mientras STURKIE (19) indica un descenso de las proteínas plasmáticas como consecuencia de la puesta, los datos de BRANDT (3) y los nuestros señalan lo contrario (tabla III).

La separación de las distintas fracciones proteicas del suero gracias a la aplicación de diferentes métodos, nos muestra la existencia de un número variable de las mismas que oscila entre cuatro y ocho.

McKINLEY y colab. (11, 12) realizan análisis con electroforesis en papel, y el empleo de un tampón veronal-metanol les permite apreciar 6 fracciones (albúmina, globulina α_1 , α_2 , α_3 , β y γ), a las que se puede adicionar una séptima (PP = fracción lipoproteica) en las hembras en puesta.

Las mismas 6 fracciones son también citadas por ANTONINI y PIVA (1) y por CAMPBELL (4). Por otra parte, BERNABAS y MENTON (2) señala igualmente 6 fracciones, pero solamente en las hembras (albúmina, globulina α_1 , α_2 , β , γ_1 , γ_2) y 7 en los machos (albúmina, globulina α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2). Por el contrario, GEISSLER y RUPP (7) señalan 8 fracciones en ambos sexos (albúmina, globulina α_1 , α_2 , α_3 , β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2).

Por mediación de la electroforesis libre (3) se aprecian 6 componentes en los machos y en las hembras no en puesta, mientras que son 7 en las hembras en puesta. Estos resultados coinciden

con los de MCKINLEY y colab. (12), aunque resulta difícil homologar esta séptima fracción obtenida por técnicas diferentes.

KAMINSKI (10) en electroforesis en gel de agar distingue 5 fracciones (prealbúmina, albúmina, globulinas α , β y γ), mientras que gracias al análisis inmuno-electrofrético consigue la identificación de 11 componentes, los cuales en orden decreciente de movilidad son los siguientes: prealbúmina, albúmina, globulina α_1 , dos globulinas α_2 , dos globulinas β_1 , dos globulinas β_2 , conalbúmina, globulina γ . Estas 11 fracciones deben considerarse pues como los verdaderos constituyentes existentes en el suero de esta especie, por el elevado poder de resolución de la técnica. Sin embargo, los métodos usuales de electroforesis señalan sólo la existencia de 6 a 7 fracciones, y sobre dicho número están de acuerdo todos los investigadores citados.

La técnica de fraccionamiento salino con Na_2SO_4 citada por BRANDT y colab. (3) proporciona cuatro fracciones proteicas (albúmina, globulinas α , β , γ). Nuestros resultados al aplicar el método de fraccionamiento con hiposulfito sódico (8), al suero de gallinas, nos ha permitido obtener 6 puntos de inflexión que señalarían la existencia de 7 fracciones, para cuya identificación se requiere un control electroforético.

Con el suero humano, el método de GRAS (8, 9) permite apreciar 3 puntos de inflexión principales que separan las cuatro fracciones básicas del suero (albúmina, globulinas α , β , γ). Dichos puntos se encuentran en las concentraciones de 30,7 gramos %, 35,5 gramos % y 44,1 gramos %, de forma que la globulina γ precipita hasta la primera concentración; la globulina β de 30,7 a 35,5 gr %; la globulina α de 35,5 a 44,1 gr %; y la albúmina, por encima de esta última concentración.

Al aplicar esta técnica al suero de otra especie, no cabe esperar que coincidan los puntos de inflexión, y así en las gallinas, en principio, parece que la fracción de 32 gr % corresponde a la globulina γ , la de 34 gr % a la β , la de 37 gr % a la α y las restantes a la albúmina. El análisis electroforético de los precipitados (fig. 4) concuerda en lo que se refiere a la precipitación de la globulina α , y a las albúminas que aparecen claramente en los precipitados de 37 y 44 gr % respectivamente. Por el contrario, la globulina β parece ya hallarse en la precipitación de 30 gr %. De estos resultados puede concluirse que, siguiendo la técnica electroforética indicada, los diferentes puntos de inflexión hallados en el fraccionamiento salino, no tengan en todos los casos su correspondencia electroforética. Cabe pensar en que las condiciones experimentales dispuestas para tal electroforesis no proporcionen una buena

definición con este suero o que algunos puntos de inflexión sean secundarios.

Por lo que hace referencia al estudio cuantitativo de estas distintas fracciones y a sus variaciones respecto a la madurez sexual y a la puesta, pueden señalarse los datos de varios autores (2, 4, 7) los cuales concuerdan en apreciar en las hembras en puesta un aumento de la fracción β y descenso de la albúmina, aunque uno de ellos (2) lo relaciona simplemente con la madurez sexual sin especificar el estado de puesta.

BRANDT y colab. (3) con las fracciones separadas por precipitación salina, aprecian una semejanza tanto cualitativa como cuantitativa entre las fracciones de pollos y gallinas no en puesta de igual edad, y señalan que el aumento progresivo del contenido en proteínas totales es debido principalmente al aumento de la fracción globulina α y globulina γ , mientras que por el contrario, el aumento de la fracción globulina β y albúmina es muy pequeño. Sus estudios con electroforesis libre confirman estos resultados y aprecian un componente I (5,1 %) específico de las hembras en puesta.

Nuestros resultados con el método de fraccionamiento salino nos proporcionan valores medios (tabla II) que, en la fracción de 34 gr % que debe corresponder a la β globulinas, resultan superiores en las hembras en puesta a las no en puesta, pero la apreciación de sus correspondientes desviaciones standard puede eliminar toda posible significación a la diferencia.

Este aumento en la fracción de las globulinas β , que parece evidente por la concordancia de los datos de varios autores, presentaría un interés especial para nosotros al relacionarlo con el transporte del hierro por el suero, pues si bien no puede atribuírsele a un aumento exclusivo de la β_1 — globulina fijadora del hierro, cabe pensar en el aumento de otra fracción de propiedades parecidas. Tenemos distintos argumentos para sospechar la intervención de otra fracción proteica en el transporte del Fe en las gallinas en puesta (16, 17), centradas principalmente en la presencia de conalbúmina en el suero de esta especie.

Al relacionarse los valores de albúminas y globulinas de cada suero entre sí, se obtiene el valor Alb/Glob. que muestra de forma más general las diferencias entre los sexos y con respecto el fenómeno de la puesta. STURKIE y NEWMAN (19) señalan cómo este cociente varía de 0,60 en las hembras no en puesta, a 0,70-0,75 en los machos, para ascender claramente en las hembras en puesta (0,80-0,95), lo que muestra cómo los valores de las globulinas son superiores siempre al de las albúminas, pero que en las gallinas en puesta hay tendencia a disminuir esta diferencia.

Resumen

Se ha llevado a cabo un estudio sobre las proteínas plasmáticas en la gallina por mediación de una técnica de fraccionamiento salino con hiposulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Han sido estudiados dos sueros de pollos, 12 de gallinas no en puesta y 14 de gallinas en puesta.

Las curvas de fraccionamiento obtenidas permiten apreciar la existencia de 6 puntos de inflexión. Se comparan estos puntos con los citados con el suero humano. Los precipitados obtenidos en cada punto son analizados electroforéticamente.

Han sido determinadas por micro-kjeldahl las proteínas totales de varios ejemplares de los tres lotes de aves, y se han calculado los porcentajes medios de cada una de las fracciones obtenidas con el hiposulfito.

Se discuten los resultados conseguidos con los datos hallados en la bibliografía referentes a valores de proteinemia, número de fracciones, porcentaje de las mismas, cociente albúmina/globulina, con relación a la edad, sexo y estado sexual de las hembras.

Summary

The plasma proteins in the chicken

There are different works dedicated to the plasma proteins in hens realized with free electrophoresis (6), paper electrophoresis (1, 2, 4, 5, 7, 11), agar gel electrophoresis (10), as well as for saline precipitation with Na_2SO_4 (3).

Our study presents an experimental aspect together with a brief review on this field, specially in connection with the sex and the laying period. The interest for these questions derives from the studies which we are carrying out about the serum iron and the transferrin (beta-1-globulin), which present special characteristics in the laying season (13, 14, 15, 16, 17):

We have studied two sera of chickens, 12 of not laying hens and 14 of laying hens, according to a salting-out method with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, proposed for the human serum (8). A series of concentrations of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (to 30-50 gr %) with the difference from 1 gr %, has been prepared and moreover of 20 gr % and 25 gr %. In the filtrate there has been determined proteins according to the biuret reaction (Weichelbaum's reactive) against a calibration curve constructed with micro-kjeldahl.

The total proteins of the serum of different specimens of both sexes have also been determined (micro-kjeldahl). In the table III are included all the values of different authors, about the total proteins in this specie, where one can check a certain relation with the state of the females.

The salting-out has permitted to notice the existence of 6 inflexion's points in the curves (fig. 1, 2, 3), which are difficult

to determine with precisión in many cases because of the little difference between the values (table I). These points may be located in the following concentrations: 32, 34, 37, 40, 43-44, 45-47 gr %. In the human serum (8, 9), 3 principal points have been stated (30,7; 35,5; 44,1 gr %) which separate the four principal fractions of the serum (albumins, alfa globulin, beta globulin and gamma globulin).

The comparison of the results of the salting-out method and the electrophoretic control of the fractions (fig. 4), show how various inflexion's points do not correspond to detectable electrophoretic variations. This may attribute to an electrophoretic technique which is little suitable and there may exist secondary inflexion's points.

The protein fractions found by other authors (1, 2, 3, 4, 5) are of six or seven, except with the salting-out (3) which show four, and with immuno-electrophoresis (10), eleven.

The different fractions prove quantitative variations with relation to sexual maturity, and some authors (2, 4, 7) notice an increase of the beta-globulin fraction and a decrease of albumin, which in a more general form may put itself evidently in an increase of the relation albumin/globulin (18, 19).

Bibliografía

- (1) ANTONINI, F. M. y PIVA, G.: *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 28, 1887, 1952.
- (2) BARNABAS, T. y MENON, K. R.: *Acta Physiol. Pharmacol. Neerlandica*, 8, 343, 1959.
- (3) BRANDT, L. W., CLEGG, R. E. y ANDREWS, A. C.: *J. Biol. Chem.*, 191, 105, 1951.
- (4) CAMPBELL, E. A.: *J. Comp. path.*, 67, 345, 1957.
- (5) COMMON, R. H., MCKINLEY, W. P. y MAW, W. A.: *Science*, 118, 86, 1953.
- (6) DEUTSCH, H. F. y GOODLOE, M. B.: *J. Biol. Chem.*, 161, 1, 1945. (Citado por 3.)
- (7) GEISSLER, H. y RUPP, G.: *Zbl. Vet. Med.*, 6, 286, 1959.
- (8) GRAS, J. y SALAZAR, M.: *R. esp. Fisiol.*, 6, 113, 1950.
- (9) GRAS, J.: *R. esp. Fisiol.*, 7, 265, 1951.
- (10) KAMINSKI, M. y DURIEUX, J.: *Experimental Cell Research*, 10, 590, 1956.
- (11) MCKINLEY, W. P., OLIVER, W. F., MAW, W. A. y COMMON, R. H.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 84, 346, 1953.
- (12) MCKINLEY, W. P., MAW, W. A., OLIVER, W. F. y COMMON, R. H.: *Canad. J. Biochem. and Physiol.*, 32, 189, 1954.

- (13) PLANAS, J. y DE CASTRO, S.: *R. esp. Fisiol.*, **16**, suppl. III, 189, 1960.
- (14) PLANAS, J.: *R. esp. Fisiol.*, **16**, 33, 1960.
- (15) PLANAS, J. y DE CASTRO, S.: *R. esp. Fisiol.*, **16**, 197, 1960.
- (16) PLANAS, J. y RECIO, J. M.: *R. esp. Fisiol.*, **16**, 265, 1960.
- (17) PLANAS, J., DE CASTRO, S. y RECIO, J. M.: *Nature*, **189**, 668, 1961.
- (18) STURKIE, P. D.: «*Avian Physiology*». Comstock Publ., 1954.
- (19) STURKIE, P. D. y NEWMAN, H. J.: *Poultry Sci.*, **30**, 240, 1951.