

Laboratorio de Biología
Universidad de Valladolid
(Prof. J. Planas)

Las haptoglobinas séricas en algunos animales*

por

J. Navarro, M. A. Areso y J. Planas

(Recibido para publicar el 22 de septiembre de 1964)

POLONOVSKI y JAYLE (16) demostraron la existencia en el suero humano de una proteína fijadora de la hemoglobina (Hb) a la que dieron el nombre de haptoglobina (Hp). Posteriormente estos autores, especialmente JAYLE y su escuela, han estudiado diferentes aspectos relacionados con esta alfa-2-globulina, analizando su constitución química, sus características físico-químicas, su comportamiento genético, así como las variaciones cuantitativas asociadas a distintos estados patológicos, como pueden apreciarse en sus revisiones (9, 10).

La presencia de dicha proteína en el suero de los vertebrados ha sido estudiada de forma muy fragmentaria y falta una labor de síntesis sobre lo publicado a fin de conocer la situación actual del problema.

Los primeros datos conocidos en los animales se deben a los propios descubridores (16) al dar los valores de actividad peroxidásica de varios mamíferos.

Las haptoglobinas se identifican igualmente en el suero por medio de las técnicas electroforéticas y revelado con benidina. Así, en la electroforesis en papel, REICH (18, 19) estudia el problema en el hombre, perro, gato, cordero, conejo,

rata, cobaya y gallo; y LIANG (12) en especies parecidas, junto con el pato, la tortuga y la rana.

Por medio de la electroforesis en gel de almidón se han identificado en diferentes primates (1, 3, 4, 13), y se han estudiado otras especies de mamíferos como el cordero y el camello (6), distintos mamíferos de uso experimental (rata, ratón, cobaya, conejo) (20), algunas especies de Alaska como la foca, la ardilla y la marmota (5). Se tienen igualmente datos dispersos en otros vertebrados, por ejemplo, en el pollo (17, 20) y en algunos peces (4, 6, 17).

Los datos referentes a la valoración cuantitativa de la haptoglobina sérica en los vertebrados son aún más reducidos y se refieren sólo al conejo (11, 14, 20), a la rata y al cobayo (11, 20) y al pollo (20). POLONOVSKI y JAYLE (16) indicaron en su primera publicación un valor relativo de la actividad peroxidásica de un ejemplar de perro, caballo, vaca, cordero, cerdo y pollo.

* Este trabajo se ha realizado con cargo al «Fomento de la Investigación en la Universidad» del Ministerio de Educación Nacional.

El polimorfismo genético de las haptoglobinas hallado en el hombre (21) no se encuentra en otros primates (1, 4, 13), en donde sólo es patente un tipo equivalente al Hp 1-1. Sin embargo, BECKMAN y CEDERMACK (3) hallan en *Macaca irus* un tipo equivalente al Hp 2-1.

En otros mamíferos estudiados, como son la rata, ratón, conejo, foca, ardilla, marmota, caballo (4, 17, 20), muestran una sola banda de Hp, que equivale igualmente al tipo Hp 1-1 humano.

En el cerdo, HESSELHOLT (7) señala un claro polimorfismo, compuesto por 4 tipos de Hp que no habían sido apreciados en el estudio de BLUMBERG (4).

En el presente estudio se analiza cualitativa y cuantitativamente el contenido en haptoglobina sérica en diferentes mamíferos (caballo, mulo, asno, buey, cordero, cabra, cerdo). La actividad peroxidásica del suero es también estudiada frente a la hemoglobina homóloga y a las hemoglobinas heterólogas, incluyéndose en este estudio a la especie humana.

Material y métodos

Los sueros animales corresponden a las especies caballo, asno, mulo, toro, cabra, cordero y cerdo. Se han analizado de 5-11 ejemplares por cada especie.

Los sueros humanos pertenecen a donadores de sangre y han sido suministrados por los laboratorios Knickerbocker.*

La tasa de haptoglobina ha sido determinada según el método de JAYLE (8) basado en el incremento de la actividad peroxidásica que experimenta la hemoglobina de caballo al ser adicionada a un suero, por la formación del complejo Hb-Hp. El hidróperóxido de etilo utilizado

como sustrato ha sido sintetizado en el laboratorio de acuerdo con la descripción de BAEYER y VILLIGER (2).

La hemoglobina de caballo, así como las correspondientes a las otras especies, han sido obtenidas según las indicaciones de JAYLE (8) y su concentración ha sido determinada por valoración fotocolorimétrica del hierro (22). Las diferentes soluciones madres se han conservado congeladas, y a partir de ellas se han obtenido cada 15 días las soluciones M/8.000 en hemoglobina; diariamente de éstas se obtienen las diluciones empleadas de M/80.000.

Los distintos sueros pertenecientes a cada especie han sido analizados, siguiendo el método indicado, frente a la hemoglobina de caballo y a las restantes hemoglobinas. En las especies lanar y caprina se indican doble número de ejemplares que en las otras especies, pues se han fusionado los datos de ambos sexos al no hallar diferencias sexuales significativas.

En los sueros humanos se han empleado también las mismas muestras frente a diferentes hemoglobinas.

La identificación electroforética de las haptoglobinas en gel de almidón se ha realizado siguiendo el método empleado por uno de nosotros en los sueros humanos (15). El gel es cortado longitudinalmente y una mitad se tiñe con una mezcla de bencidina-hidróxido de bario.

Resultados

El contenido en haptoglobina sérica según el incremento de la actividad peroxidásica de acuerdo con el método de JAYLE (8), en las diferentes especies de mamíferos estudiadas, puede apreciarse en la tabla I. En la primera fila constan las tasas obtenidas frente a la hemoglobina de caballo, según recomienda el método de JAYLE (8), mientras que en las restantes se indican los valores obtenidos con otras hemoglobinas.

* Nuestro agradecimiento al Dr. J. Viñas, director de dichos Laboratorios por el suministro de estas muestras.

Tabla I. Contenido en haptoglobina sérica en diferentes especies de mamíferos, determinado frente a la hemoglobina homóloga y a las hemoglobinas heterólogas.

HEMOGLOBINAS	Caballo		Humano		Asno		SUEROS			Cabra		Cordero		Cerdo		
							Mulo		Toro							
	N.º	Hp mg %	N.º	Hp mg %	N.º	Hp mg %	N.º	Hp mg %	N.º	Hp mg %	N.º	Hp mg %	N.º	Hp mg %	N.º	Hp mg %
Caballo	6	126 ± 16	12	228 ± 21	5	265 ± 41	5	157 ± 17	5	4 ± 1	11	4 ± 3	9	5 ± 4	6	148 ± 67
Humana	5	39 ± 16	24	90 ± 6	5	169 ± 13	6	150 ± 8	5	1 ± 2	11	1 ± 1	9	3 ± 3	5	85 ± 27
Asno	5	84 ± 31	24	163 ± 13	5	250 ± 44	6	173 ± 21	5	8 ± 1	11	3 ± 2	9	6 ± 5	5	142 ± 49
Mulo	5	64 ± 22	24	155 ± 15	5	268 ± 40	6	167 ± 13	5	5 ± 3	11	4 ± 2	9	8 ± 8	5	138 ± 47
Toro	6	65 ± 16	10	107 ± 16	5	207 ± 18	5	144 ± 41	5	2 ± 1	10	3 ± 2	10	5 ± 4	6	99 ± 46
Cabra	5	55 ± 17	24	104 ± 8	5	222 ± 41	6	145 ± 8	5	0,5 ± 0,5	11	2 ± 1	9	2 ± 2	5	127 ± 44
Cordero	6	115 ± 17	10	131 ± 12	5	212 ± 29	5	142 ± 14	5	3 ± 2	10	2 ± 2	10	3 ± 3	6	125 ± 49
Cerdo	6	102 ± 14	10	51 ± 5	6	139 ± 21	5	111 ± 15	5	4 ± 1	10	2 ± 1	10	2 ± 2	6	58 ± 21

La actividad peroxidásica de las diferentes hemoglobinas estudiadas se señala en la figura 1, en donde se indican los valores medios obtenidos en 50 determinaciones de una sola muestra de hemoglobina.

En la figura 2 se aprecia el resultado obtenido con la electroforesis en gel de almidón para la identificación de las bandas de haptoglobinas en 5 ejemplares de cada especie de mamíferos. Claramente se aprecia cómo en el asno, mulo, caballo y cerdo aparece una banda de haptoglobina equivalente al tipo Hp 1-1 humano, mientras que en las otras especies se aprecia sólo la banda correspondiente a la hemoglobina libre.

Discusión

La tasa en haptoglobina sérica en los mamíferos estudiados es sumamente diferente. Su estudio con hemoglobina de caballo, como recomienda el método de JAYLE (8), nos muestra valores altos, superiores a 140 mg. %, en cinco especies (hombre, caballo, asno, mulo y cerdo), mientras que se obtienen valores nulos con las especies toro, cordero y cabra. En estas tres especies, sin embargo, aparece algún ejemplar con una cierta actividad, lo cual determina que los errores sean muy altos.

El estudio de la actividad peroxidásica de los distintos sueros frente a otras hemoglobinas permite valorar el contenido en HP utilizando para ello complejos Hb-Hp diferentes. Este análisis comparativo resulta de gran interés, pues no existen datos concretos en la bibliografía a este respecto. En la tabla I quedan expuestos todos los resultados, en donde para el suero humano se demuestra claramente el porqué de la elección de la hemoglobina de caballo para la valoración de la haptoglobina humana en el método de JAYLE (8), al mostrar una actividad peroxidásica máxima.

LIANG (12), entre otros autores, de-

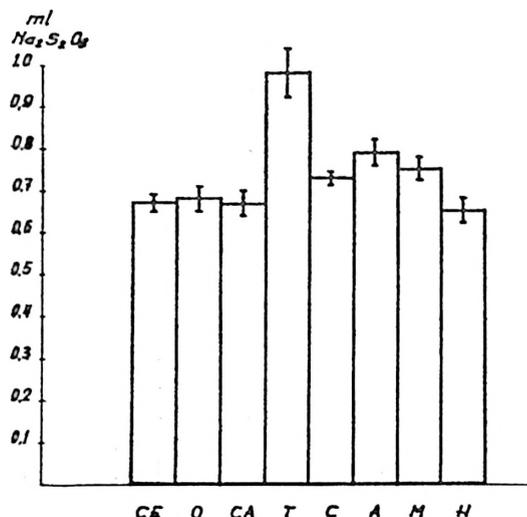


FIG. 1. Actividad peroxidásica de diferentes hemoglobinas: CE = cerdo; O = cordero; CA = cabra; T = toro; C = caballo; A = asno; M = mulo; H = hombre. Valores medios de 50 determinaciones para una sola muestra de hemoglobina. Concentración: 0,1 ml M/80.000 Hb.

muestra cómo la capacidad de fijación de las haptoglobinas animales es la misma tanto para su hemoglobina homóloga como para las heterólogas. Sin embargo, no existen datos concretos sobre la variación de la actividad peroxidásica del complejo, ocasionada por la sustitución específica de la hemoglobina.

En general, en las cinco especies que muestran una tasa de haptoglobina alta (hombre, caballo, asno, cerdo y mulo) presentan los valores máximos con la hemoglobina de caballo, excepto para el mulo, cuyo máximo se alcanza con la hemoglobina de asno.

En las especies toro, cordero y cabra, aparecen tasas nulas con todas las hemoglobinas. La ausencia de haptoglobina en el suero de estos mamíferos es curiosa, por separarse de la línea general, y por formar parte de un grupo taxonómico bien definido.

Sin embargo, debe señalarse como utilizando el mismo método de valoración que nosotros, RIOU y col. (20) hallan

una tasa nula en el cobayo mientras que en otras especies del mismo orden dan valores positivos (conejo: 99 mg %; rata: 75 mg % y ratón: 28 mg %). Sin embargo, JONES y col. (11), utilizando un método electroforético, dan una tasa media para 3 ejemplares de cobaya de 90 mg %.

Por otra parte, POLONOVSKI y JAYLE (16) señalan cómo no se halla sustancia activadora de la hemoglobina en el suero del cobayo; estos autores indicaron igualmente cómo en el buey, cordero y cerdo esta sustancia se detecta muy débilmente, mientras en el conejo aparece en algún ejemplar, y es alto su contenido en el caballo, perro y en el mono.

Las actividades peroxidásicas de las distintas hemoglobinas estudiadas muestran valores muy próximos y es posible agruparlos en: a) las hemoglobinas humanas, cerdo, cordero y cabra dan los valores bajos; b) la hemoglobina de caballo, asno y mulo, con los valores intermedios, y c) la hemoglobina de toro, con una actividad claramente superior.

Al comparar las actividades peroxidásicas de las hemoglobinas con las tasas de haptoglobinas obtenidas se aprecia

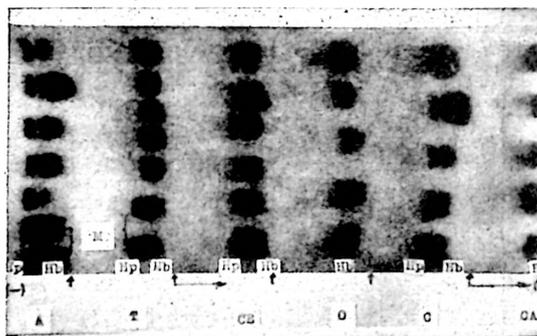


FIG. 2. Identificación de las haptoglobinas por electroforesis en gel de almidón en 7 especies de mamíferos; igualdad de signos que en la figura anterior. Las flechas verticales indican el lugar de inserción de las muestras, mientras que las horizontales, el desplazamiento electroforético. Hp = banda de la haptoglobina (complejo Hp-Hb). Hb = banda de la hemoglobina libre.

que precisamente con las del primer grupo se obtienen las tasas más bajas, mientras que con las del grupo *b*) dan valores más altos, y que se obtienen valores medios con la hemoglobina de toro.

El estudio realizado en la electroforesis en gel de almidón de las mezclas de sueros de mamíferos y hemoglobina humana ha permitido identificar una banda de haptoglobina en el asno, mulo, caballo y cerdo, mientras que no aparece en el toro, cordero y cabra (fig. 2). Estos resultados concuerdan, pues, con los valores medios de las tasas señaladas en la tabla I. En las especies en que se aprecia la banda de la haptoglobina, ésta corresponde al tipo Hp 1-1 del hombre, como es frecuente en los animales (4).

Por medio de esta técnica electroforética había sido ya señalada la presencia de una banda de la haptoglobina en el caballo, así como su ausencia en el cordero (17), en un estudio con 300 ejemplares. En el cordero tampoco es detectable por medio de la electroforesis en papel (19). En el cerdo, por el contrario, BLUMBERG (4) observa como nosotros, en 5 ejemplares, una haptoglobina equivalente al tipo Hp 1-1, mientras que en la raza estudiada por HESSELHOLT (7) aprecia un polimorfismo constituido por 4 tipos.

En la especie vacuna no hemos podido señalar una banda de haptoglobinas, mientras que ha sido observada por otros autores en otras razas (5, 17).

La identificación de la haptoglobina en el mulo y asno, así como su ausencia en la cabra, no hemos hallado ningún precedente en la bibliografía.

Es interesante señalar cómo la mayoría de mamíferos corresponden al tipo Hp 1-1 y el gen Hp² es exclusivo del hombre, pues se halla ausente en los primates (1, 4, 13) o es muy raro (3). Otros mamíferos presentan bandas que no tienen una clara correspondencia con las humanas y, entre otras, han permi-

tido a BLUMBERG y col. (5) apreciar dos fenotipos en la foca, y un polimorfismo de 4 tipos en el cerdo según HESSELHOLT (7).

Resumen

Se estudian las haptoglobinas séricas de 7 especies de mamíferos (caballo, mulo, asno, toro, cordero, cabra y cerdo) por medio de una técnica cuantitativa (método iodométrico de Jayle), y cualitativa (electroforesis en gel de almidón). En este estudio se incluye también a la especie humana.

La actividad peroxidásica sobre la que se basa la técnica cuantitativa es analizada frente a la hemoglobina homóloga y a las distintas hemoglobinas heterólogas.

Se aprecian claras diferencias específicas en cuanto a la tasa de haptoglobina, dando valores nulos en el cordero, la cabra y en el toro.

La sustitución de las hemoglobinas ocasiona una variación cuantitativa notable en los resultados obtenidos frente a la hemoglobina de caballo.

Las especies que dan una tasa positiva, se identifica por medio de la electroforesis en gel de almidón, una banda de haptoglobina equivalente al tipo Hp 1-1 humano. No se aprecia ninguna banda en las restantes.

Se discuten los resultados obtenidos con los hallados en la bibliografía.

Summary

The serum Haptoglobins in certain mammals

A study has been made of the serum haptoglobins of 7 species of mammal (horse, mule, ass, bull, sheep, goat and pig) by means of a technique both quantitative (iodometric method of JAYLE) and qualitative (electrophoresis of starch gel). This study also includes the human species.

The peroxidase activity on which the quantitative technique is based is analyzed in relation to the homologous hemoglobin and the different heterologous hemoglobins.

Clear specific differences can be appreciated with regard to the rate of haptoglobin, giving null values in the sheep, the goat and the bull.

The substitution of the hemoglobins causes a notable quantitative variation in the results obtained with the horse hemoglobin.

The species which give a positive rate are identified by means of electrophoresis in starch gel, as showing one band of haptoglobin equivalente to the Hp 1-1 type in humans. No band can be appreciated in the remaining species.

Bibliografía

- (1) ARENDS, T. y RODRÍGUEZ, M. L. : *Nature* (Lond.), **185**, 325, 1960.
- (2) BAEYER y VILLIGER : *Ber. Chem. Ges.*, **34**, 728, 1961.
- (3) BECKMAN, L. y CEDERMARK, G. : *Nature* (Lond.), **186**, 643, 1960.
- (4) BLUMBERG, B. S. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **104**, 25, 1960.
- (5) BLUMBERG, B. S., ALLISON, A. C. y GARRY, B. : *J. Cellular Comp. Physiol.*, **55**, 61, 1960.
- (6) BUNDSCHUH, G. : *Dtsch. Gesundh. Wes.* (Berlín), **15**, 2103, 1960.
- (7) HESSELHOLT, M. : *Acta Vet. Scand.*, **4**, 238, 1963.
- (8) JAYLE, M. F. : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 876, 1951.
- (9) JAYLE, M. F. y MORETTI, J. : *Progress in Hematology*, **3**, 342, 1962.
- (10) JAYLE, M. F. : *Les Haptoglobines*. Masson et Cie. (Paris), 1963.
- (11) JONES, N. C. H., GARDNER, B. y HELPS, R. : *Biochem. J.*, **79**, 220, 1961.
- (12) LIANG, C. C. : *Biochem. J.*, **66**, 552, 1957.
- (13) MÄKELÄ, O., RENKONEN, O. V. y SOLO-NEN, E. : *Nature* (Lond.), **185**, 852, 1960.
- (14) MURRAY, R. K. y CONNELL, G. E. : *Nature* (Lond.), **186**, 86, 1960.
- (15) PLANAS, J. : *Genét. Ibér.*, **15**, 103, 1963.
- (16) POLONOVSHI, M. y JAYLE, M. F. : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **21**, 66, 1939.
- (17) PROKOP, O y BUNDSCHUH, G. : *Die Technik und die Bedeutung der Haptoglobine und Gm-Gruppen in Klinik und Gerichtsmedizin*. Walter de Gruyter & Co. (Berlín), 1963.
- (18) REICH, M. : *Austral. J. Exp. Biol.* **84**, 151, 1956.
- (19) REICH, M. : *Austral. J. Exp. Biol.*, **34**, 343, 1956.
- (20) RIOU, G., PAOLETTI, C. y TRUHAUT, R. : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **44**, 149, 1962.
- (21) SMITHIES, O. : *Biochem. J.*, **61**, 629, 1955.
- (22) WONG, J. : *J. Biol. Chem.*, **77**, 409, 1928.