REVISTA ESPAÑOLA DE FISIOLOGIA
R. esp. Fisiol., 21, n.º 4, págs. 179-185, 1965

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

Ensayos "in vivo" e "in vitro" con Fe-59 en "Gallus domesticus" referentes al transporte del hierro por el suero

por

M.ª C. Martín-Mateo, M.ª F. Sebastián y J. Planas

(Recibido para publicar el 25 de noviembre de 1965)

La presencia de la conalbúmina en el suero de las aves ha sido demostrada en el trabajo de MARSHALL y DEUTSCH (6). La intervención de dicha proteína en el transporte del hierro sérico en la gallina fue sugerida por estos autores, y, más tarde, ha sido confirmada por PLANAS y colaboradores (6, 13), quienes en estudios anteriores realizados en distintas aves (10, 14), habían supuesto la existencia de una segunda fracción proteica que actuaría como auxiliar de la transferrina en dicho transporte.

El estudio comparativo entre la transferrina y la conalbúmina nos muestra la analogía entre sus propiedades físicas y químicas (1, 2, 15, 17). KAMINSKI y DURIEUX (4) consideran ambas proteínas como β-globulinas lentas y muy próximas entre sí. WILLIAMS (18) lleva a cabo un extenso análisis comparativo de estas dos proteínas del suero de la gallina, y su resultado indica claramente la identidad de la fracción proteica de ambas glucoproteínas, lo cual justifica el estrecho parentesco inmunológico observado.

En el presente trabajo se lleva a cabo un estudio del transporte del hierro sérico con ayuda de hierro radiactivo a fin de poner en evidencia los dos mecanismos de transporte, y a la vez comprobar la identidad inmunológica de ambas proteínas.

Material y métodos

El presente estudio ha sido realizado con 10 ejemplares diferentes. Se ha determinado el hierro sérico y la capacidad total de fijación por los métodos propuestos por RAMSAY (12, 13).

El hierro radiactivo empleado procede del Radiochemical Centre (Amersham, Inglaterra) y se halla como citrato férrico en una solución estéril e isotónica. La concentración ha sido en las dos partidas recibidas de 110 µc y 550 µc y ha correspondido a una radiactividad por peso de elemento de 8,1 a 10,8 µc/µgm Fe, respectivamente.

El Fe-59 ha sido inyectado por vía endovenosa; las concentraciones varían entre 12 y 35 µc/kg. peso corporal. Igualmente se han llevado a cabo ensa-

yos «in vitro», adicionando de 0,032 μc hasta 12 μc por ml. suero.

La posición del hierro radiactivo dentro de las fracciones proteicas, ha sido analizada por medio de electroforesis en papel, y la inmunoelectroforesis se ha realizado con tampón de veronal y en una cubeta Immunophor-Plenger, en cristales porta-objetos.

La radioactividad de las bandas de electroforesis en papel han sido medidas con el dispositivo especial diseñado por PHILIPS para cromatogramas (PW 4129) y el contaje se realiza en la unidad indicada más abajo. En las inmuno-electroforesis, así como también en ciertas bandas de papel se han realizado autorradiografías con película Rayos X Valca.

Los inmunosueros han sido obtenidos en conejos frente a suero total de gallina y a conalbúmina (Sigma Chemical Co.) y a transferrina de la misma especie. Esta última ha sido obtenida en el laboratorio a partir de suero de gallina, siguiendo el método de KORINEK (4); la transferrina utilizada en la inmunización resultaba pura al análisis inmunoelectroforético. La dosis de los antígenos empleados en la inmunización eran del orden de 67 mg. de transferrina en un mes, y 90 mg. para la conalbúmina, y 100 mg. para el suero. No se han utilizado coadyuvantes en la inmunización.

La radiactividad del suero se determina en un volumen de 0,1 ml., previa desecación bajo lámpara de infrarrojos, en un equipo de contaje Philips (contador de 10 décadas, tipo PW 4043 y tubo GM PW 18536, de 34 mm. diámetro y 38 mm. longitud total).

El estudio inmunológico realizado entre la conalbúmina y la transferrina ha sido ampliado con la utilización del método de doble difusión según OUCHTERLONY (8), y en algunas preparaciones se han obtenido autorradiografías.

Resultados

1. — *Actividad y situación del Fe-59 en las fracciones proteicas del suero.*

a) *In vivo:*

La dosis de Fe-59 inyectada oscila entre 13 μc/kg. y 35 μc/kg. peso corporal. Durante los cinco primeros minutos después de la inyección endovenosa del compuesto radiactivo, la actividad del suero es del orden de 0,04 a 0,5 μc/ml. y decae lentamente con el tiempo (Tabla I).

El cálculo teórico de la radiactividad, teniendo en cuenta el volumen de sangre de cada ejemplar (9,5 % del peso corporal para los machos y 8 % para las hembras, según STURKIE [16]), nos muestra cómo la fijación del Fe-59 por los tejidos es ya en los 3-5 minutos de la inyección, del orden del 60-90 % en los pollos, mientras que en las gallinas es como máximo de un 19 %, y en al-

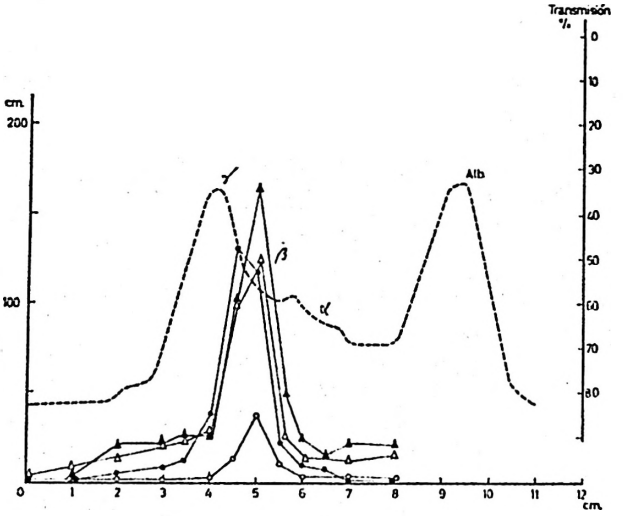

FIG. 1. Situación de la radiactividad en las fracciones proteicas del pollo núm. 39, separadas por electroforesis en papel:
«in vivo»: ○
«in vitro»: ● 0,032 μc/ml suero
△ 0,12 μc/ml suero
▲ 0,30 μc/ml suero

TABLA I

Valores de sideremia (S), capacidad total de fijación del suero (CTF), cantidad de Fe-59 inyectada y radiactividad hallada en el suero a distintos intervalos, expresados en minutos. Igualmente se hace constar los ensayos realizados «in vitro».

Ejemplar Sexo Puesta	Peso gr.	S µg Fe %	CTF µg Fe %	Dosis Fe-59 inyectada	Radiactividad del suero µc/ml suero	Ensayos *in vitro*
N.º 39 ♂	1.225	110	270	15 µc	3' 0,04	0,032 µc/ml. 0,12 µc/ml. 0.30 µc/ml.
N.º 41 ♂	4.600	240	270	100 µc	3' 0,38 — 11' 0,36 — 18' 0,36 — 60' 0,20	
N.º 40 ♀ NP	1.775	180	240	30 µc	3' 0,27	2 µc/ml. 6 µc/ml.
N.º 91 ♀ P	2.075	380	230	40 µc	4' 0,12 — 12' 0,16	1,2 µc/ml. 3,2 µc/ml. 12,4 µc/ml.
N.º 96 ♀ NP	1.758	330	300	35 µc	4' 0,26 — 8' 0,23 — 17' 0,17	1,2 µc/ml. 3,2 µc/ml. 12,4 µc/ml.
N.º 97 ♀ P	1.775	550	315	30 µc	4' 0,23 — 8' 0,16 — 17' 0,12	1,2 µc/ml. 3,2 µc/ml. 12,4 µc/ml.
N.º 99 ♀ P	1.950	410	375	50 µc	5' 0,5 — 7' 0,45 — 14' 0,4 — 18' 0,36	
N.º 100 ♀ P	1.950	550	382	70 µc	3' 0,39 — 10' 0,38 — 15' 0,45 — 25' 0.41	
N.º 92 ♀ P	2.135	—	—	64 µc + 100 µg Fe estable	3' 0,3 — 7' 0,26 — 15' 0,2 — 20' 0.11	
N.º 98 ♀ P	2.020	—	—	64 µc + 200 µg Fe estable	4' 0,26 — 7' 0,26 — 14' 0,24 — 25' 0,15	

P = en puesta; NP = no en puesta.

gunos casos es nula; por el contrario, las muestras obtenidas en intervalos posteriores, muestran una progresiva reducción de la radiactividad, consecuencia del aumento de la fijación por los tejidos; a esta regla general constituye una excepción la gallina en puesta núm. 100, pues la radiactividad asciende ligeramente en los quince minutos. A la vista de los resultados expuestos, no parece evidente una diferencia sexual, o relacionada con la puesta, respecto a la caída de la radiactividad en el suero. Solamente en las hembras números 91 y 98 cuya administración de Fe-59 fue acompañada de hierro estable, se aprecia un nivel inicial de actividad más bajo y un descenso de la misma más rápido.

La localización del Fe-59 en proteinograma es siempre en nivel de las β-globulinas (fig. 1, 2, 3). En las gallinas en puesta, donde la capacidad de transporte

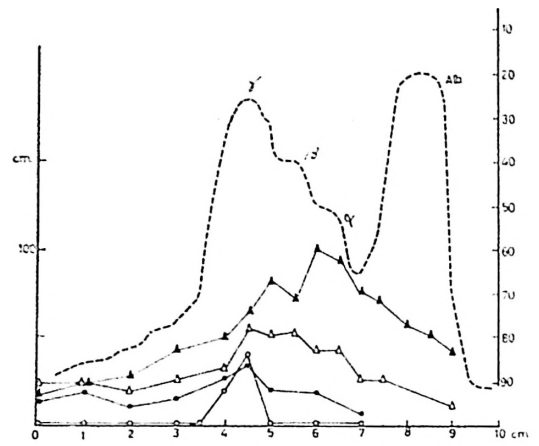

FIG. 2. Efectos de la adición de cantidades crecientes de Fe-59 en el suero de gallina (número 97), en puesta, respecto a la localización de la radiactividad :

«in vivo» : ○
«in vitro» : ● 1,2 μc/ml suero
△ 3,2 μc/ml suero
▲ 12,4 μc/ml suero

está saturada, también sucede lo mismo, e incluso no se modifica cuando se asocian 100 y 200 μg de hierro estable (en forma también de citrato), a la dosis de Fe-59.

b) *In vitro:*

El suero cargado «in vivo» con Fe-59 perteneciente a varios ejemplares, ha sido posteriormente empleado en experiencias «in vitro», destinadas a estudiar el transporte de hierro radiactivo a diferentes sobrecargas.

Las dosis de Fe-59 adicionadas han oscilado entre 0,032 a 12,4 μc/ml. suero, y en cada ejemplar se ha comprobado el efecto de tres dosis crecientes, que han sido de 0,032; 0,12 y 0,30 μc/ml. o de: 1,2; 3,2 y 12,4 μc/ml.

Se observa un aumento creciente de la radiactividad y en general desplazamiento progresivo del valor máximo, desde el nivel de la globulina beta hacia la zona de las globulinas alfa.

En algunos ejemplares, como las gallinas número 97 y número 99, es patente la aparición de otra fracción proteica que carga selectivamente el Fe-59, y corresponde a la zona de las globulinas alfa.

En contra de estos resultados, en otros ejemplares (gallinas número 40 y número 91; y pollo número 39), es evidente sólo una fracción con radiactividad, aunque su valor máximo crece y se desplaza en algunos ejemplares hacia la derecha de acuerdo con la dosis. En las figuras 1, 2 y 3, pueden apreciarse estos resultados. No se halla ninguna relación con el sexo o con el estado sexual en las hembras que pueda coordinar estos hechos; su comportamiento parece responder a características individuales más bien que a estados fisiológicos.

2. — *Análisis por inmunoelectroforesis y por doble difusión con sueros cargados «in vivo» con Fe-59.*

El empleo de inmunosueros de conejo anti-transferrina, anti-conalbúmina y an-

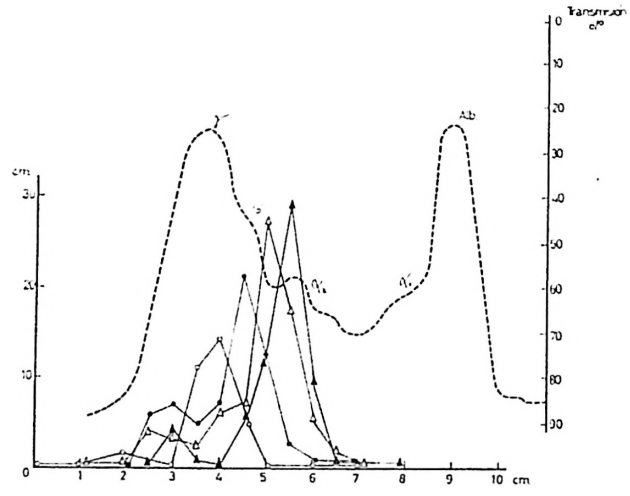

FIG. 3. Efecto de la adición de cantidades crecientes de Fe-59 en el suero de gallina (número 91), en puesta, respecto a la localización de la radiactividad :

«in vivo» : ○
«in vitro» : ● 1,2 μc/ml suero
△ 3,2 μc/ml suero
▲ 12,4 μc/ml suero

tisuero total, ha permitido realizar diferentes inmunoelectroforesis y ensayos con doble difusión. En todos los casos han sido obtenidas las correspondientes autorradiografías. Los sueros utilizados han correspondido siempre a las muestras de mayor radiactividad.

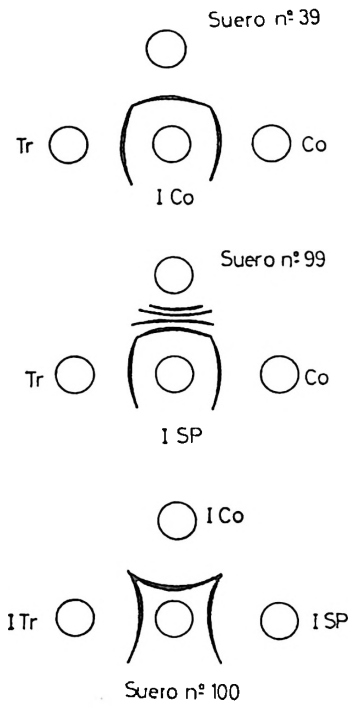

FIG. 4. Ensayos con doble difusión, mostrando la identidad inmunológica entre la transferrina (Tr) y la conalbúmina (Co) en distintos sueros y soluciones, frente a inmuno-sueros anticonalbúmina (ICo), antitransferrina (ITr) y antisuero total de gallina (ISP).

En los ensayos realizados se hace patente el parentesco inmunológico entre la transferrina y la conalbúmina, manifestado en las placas Ouch-terbony por la continuidad de las líneas vecinas (figura 4) y en la inmunoelectroforesis por aparecer una sola línea de precipitación, incluso frente a una mezcla de ambos antígenos (fig. 5).

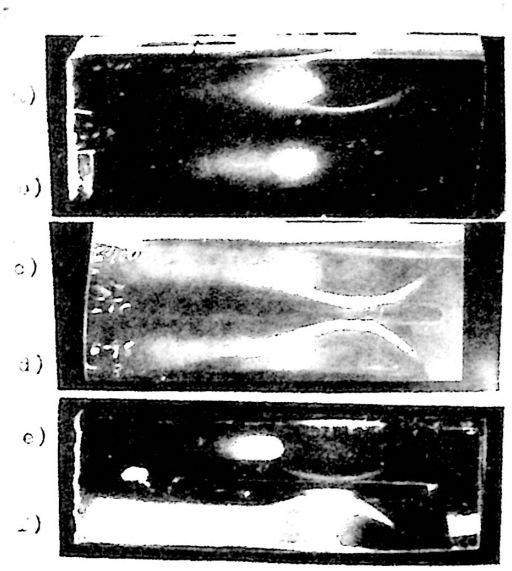

FIG. 5. Autorradiografías de inmunosueros obtenidas con sueros marcados «in vivo» y soluciones de conalbúmina y transferrina marcadas «in vitro» con Fe-59, frente a distintos inmunosueros :

a) Suero núm. 92, y *b*) solución de conalbúmina, frente a inmunosuero total de gallina.

c) Suero núm. 100, y *d*) suero núm. 98, frente a un inmunosuero antitransferrina de gallina.

e) Suero núm. 98, y *f*) mezcla de soluciones de conalbúmina y transferrina de gallina, frente a un inmunosuero total de gallina.

Discusión

Resulta evidente a la luz de los resultados «in vivo» que la radiactividad se sitúa selectivamente en una banda única, correspondiente a las β-globulinas. Este hecho es observable en todos los ejemplares analizados, mostrándose, pues, independiente con el sexo y el estado en las hembras.

La adición de hierro radiactivo a sueros ya cargados en ensayos «in vivo» ha permitido apreciar una clara diferenciación entre los ejemplares, la cual tampoco guarda relación con las características de los mismos.

En varios casos se demuestra cómo «in vitro» las distintas globulinas pueden cargar el Fe radiactivo, e incluso en las concentraciones más altas aparecen dos fracciones bien diferenciadas. Se confirman en parte las observaciones señaladas en una publicación anterior (9) y con la técnica empleada (electroforesis en papel a *p*H 8,6) no ha sido posible, pues, hallar la banda única que aprecian BARBER y SCHEELER (2), con electroforesis en gel de almidón a *p*H 7; estos autores, por el contrario, hallan dos fracciones transportadoras de hierro cuando se realiza la electroforesis a *p*H 5.

La relación inmunológica entre la transferrina y la conalbúmina resulta evidente después de los ensayos con inmunoelectroforesis y por medio de doble difusión en gel. Esta conclusión era previsible después del estudio comparativo de WILLIAMS (18), y en el presente trabajo han podido confirmarse gran parte de los resultados inmunológicos allí consignados.

A la vista de los presentes resultados es necesario un estudio de carácter cuantitativo, para apreciar las reacciones de precipitación de estos dos antígenos frente a los inmunosueros homólogos y heterólogos, y de este modo ajustar los datos expuestos en publicaciones anteriores (6, 11).

Resumen

Se llevan a cabo ensayos *in vivo* e *in vitro* con Fe-59 en ejemplares de ambos sexos de la especie *Gallus domesticus*.

En los ensayos *in vivo* se comprueba que la radiactividad se fija selectivamente en nivel de la β-globulina, con independencia del grado de saturación de la transferrina.

Los experimentos *in vitro* realizados con cargas crecientes de Fe-59 muestran comportamientos distintos, desplazándose la radiactividad hacia la zona de las globulinas α y apreciándose claramente dos fracciones en algunos ejemplares. La variedad de los resultados no permiten establecer ninguna relación con el sexo o el fenómeno de la puesta de las hembras.

La obtención de transferrina del suero de esta especie y la existencia en el mercado de la conalbúmina (Sigma Chem. Co.) han permitido unos ensayos de carácter inmunológicos (inmunoelectroforesis y difusión en gel de agar) y sus correspondientes autorradiografías con preparados y sueros marcados con Fe-59, que muestran el estrecho parentesco entre ambas proteínas. Esta observación viene en favor de ciertos datos en la bibliografía que apuntan en este sentido.

Summary

Assays "in vivo" and "in vitro" with Fe-59 on "Gallus domesticus" as regards transport of iron through serum.

Tests have been carried out, *in vivo* and *in vitro*, with Fe-59, on individuals of both sexes of the species *Gallus domesticus*.

In the tests *in vivo* it has been shown that radioactivity is selectively fixed at the level of the β-globuline, independently of the degree of saturation of the transferrin.

The *in vitro* experiments carried out with ever-increasing proportions of Fe-59 show different behaviours the radioactivity shifting towards the zone of the globulines α and two fractions being clearly seen in some specimens. The variety of the results does not allow us to establish any relation with the sex or with laying phenomenon in the females.

The obtaining of transferrin from the serum of this species, together with the existence on the market of conalbumin (Sigma Chem Co.), had made possible some tests of an immunological character (immunoelectrophoresis) and diffusion in agar gel and their corresponding autoradiographies with preparations and serums marked with Fe-59, which show the close relation between the two proteins. This observation suports certain data in the bibliography which point in this direction.

Bibliografía

(1) BAIN, J. A. y DEUTSCH, H. F. : *J. Biol. Chem.*, **172**, 547, 1948.

(2) BARBER, A. A. y SHEELER, P. : *Comp. Biochem. Physiol.*, **2**, 233, 1961 ; ibid, **8**, 115, 1963.

(3) DREYFUS, J. C. y SHAPIRA, G. : Le Fer. Expansion Scientifique Française, París, 1958.

(4) KAMINSKI, M. y DURIEUX, J. : *Exp. Cell Research*, **10**, 590, 1956.

(5) KORINEK, J., FEIOVA, M. y CEJKA, J. : *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.* **25**, 2679, 1960.

(6) MARTÍN-MATEO, M.ª C. y PLANAS, J. : *R. esp. Fisiol.*, **21**, 1, 1965.

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

(8) OUCHTERLONY, O. : *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **32**, 231, 1953.

(9) PLANAS, J. y CASTRO, S. DE : *R. esp. Fisiol.*, **16**, 277, 1960.

(10) PLANAS, J., RECIO, J. M. y CASTRO, S. DE : *Nature* (Lond.), **189**, 668, 1961.

(11) PLANAS, J. y MARTÍN-MATEO, M.ª C. : *R. esp. Fisiol.*, **21**, 9, 1965.

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

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

(14) RODRÍGUEZ, R. y PLANAS, J. : *R. esp. Fisiol.*, **20**, 83, 1964.

(15) SCHULTZE, H. E., HEIDE, K. y MÜLLER, H. : *Behringwerk Mittel.*, **32**, 25, 1957.

(16) STURKIE, P. D. : Avian Physiology. – Comstock Publ. Ass., Ithaca, New York, 1954.

(17) WARNER, R. C. y WEBER, I. : *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 5094, 1953.

(18) WILLIAMS, J. : *Biochem. J.*, **83**, 355, 1962.