

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

La conalbúmina y el transporte del hierro sérico en las aves.

I. - Estudio en la gallina (*Gallus domesticus*)

por

M.^a C. Martín-Mateo y J. Planas

(Recibido para publicar el 25 de septiembre de 1964)

El transporte del hierro sérico se realiza en los vertebrados unido a una beta-1-globulina, que por ello se conoce con el nombre de transferrina o siderofilina.

En los mamíferos esta proteína transporta normalmente una cantidad de hierro (hierro sérico o sideremia), que sólo representa un 20-30 % de su capacidad (conteniendo en transferrina o capacidad total de fijación del suero), obteniéndose valores próximos tanto en el hombre como en los mamíferos estudiados (11, 15).

En las aves, el hierro viaja igualmente unido a la fracción betaglobulina, según pudo comprobar PLANAS y CASTRO (16) y BARBER y SHEELER (2) en la gallina y en el pato.

RAMSAY y CAMPBELL (21) demostraron en la gallina como el fenómeno de la puesta eleva 5-9 veces el valor del hierro sérico.

HALKETT y colaboradores (8) comprobaron como la mitad del Fe-59 inyectado se deposita en el huevo y el resto se emplea en la síntesis de la hemoglobina.

PLANAS y CASTRO (17) confirman la observación de RAMSAY y CAMPBELL y aprecian en las gallinas en puesta una inversión paradójica en los valores de hierro sérico y capacidad total de fijación. Posteriormente se ha demostrado la completa saturación de la transferrina en estos casos (24).

Otros trabajos realizados en este laboratorio sobre este problema en otras especies, como el pato (18), pavo (14) y paloma (20), muestran la influencia del estado sexual en las hembras y del fenómeno de la puesta, el cual es más o menos marcado según las especies.

El hallazgo en varias especies durante la puesta de valores superiores de hierro sérico a los de capacidad total de fijación nos ha inducido a la hipótesis de la existencia de otra fracción proteica, auxiliar de la transferrina (17, 19).

La conalbúmina es una proteína de la clara del huevo, cuya distribución en las distintas especies así como sus características específicas se deben en gran

parte a los trabajos de FEENEY y su escuela (3, 4).

MARSHALL y DEUTSCH (12) señalan la presencia de conalbúmina en el suero de la gallina, y la relacionan por primera vez con la capacidad de fijación del hierro, y muestran su identidad inmunológica con la conalbúmina de la clara del huevo, de la que se diferencia sólo por su movilidad electroforética y por su punto isoeléctrico.

KAMINSKI y DURIEUX (10) demuestran nuevamente su existencia en el suero de esta especie y confirman su identidad inmunológica con la del huevo por medio de la inmuno-electroforesis y técnica de OUCHTERLONY.

Son conocidos ya desde los primeros trabajos de SHADE y CAROLINE (25) y ALDERTON y colaboradores (1) las propiedades quelatantes de la conalbúmina con los metales, así como posteriormente otros autores (6, 26) han descrito otras propiedades que permiten establecer un paralelismo entre la transferrina y la conalbúmina. WILLIAMS (28) analiza ambas proteínas del suero de la gallina, desde distintos puntos de vista, e indica el estrecho parentesco entre ambas, que se manifiesta incluso en la semejanza de su polimorfismo.

El presente trabajo tiene por finalidad el estudio de la posible intervención de la conalbúmina sérica en el transporte del hierro en la gallina.

Material y métodos

Las muestras de sangre se han obtenido por punción en la vena radial, los sueros han sido estudiados inmediatamente o de lo contrario se han conservado en el congelador.

La presencia de conalbúmina en el suero ha sido estudiada gracias al método inmunológico de OUCHTERLONY (13) y a la inmuno-electroforesis según GRABAR (7).

La valoración cuantitativa de dicha

proteína se ha realizado según un método inmunológico (9), basado en la reacción específica de precipitación entre antígeno y anticuerpo.

El inmunosero anti-conalbúmina ha sido obtenido en conejos, por inyección subcutánea de 90-100 mg. conalbúmina cristalizada (Sigma Chem. Co. St. Louis, USA) por 2-2,5 Kg. peso corporal. El antígeno se inyecta en una suspensión de albúmina al 1 %, y se reparte en 3 inyecciones semanales durante un mes. A los 6 días después de la última inyección se extrae sangre de la vena marginal de la oreja (20-30 cc). El inmunosero se centrifuga y se conserva en la nevera previa adición de mertiolato hasta una concentración final de 1:10,000.

Para cada inmunosero anti-conalbúmina se obtiene una curva patrón (Fig. 1) al mezclar, en igualdad de volumen, cantidades crecientes de antígeno (12,5; 25; 50; 100; 200 μ g. N₂ antígeno) ante una cantidad constante de antisuero.

La valoración de la conalbúmina en el suero se realiza en el tramo ascendiente (zona de exceso de anticuerpo) de la curva, para lo cual se diluye el suero de 1:10 a 1:30, según la potencia del inmunosero. En la determinación de las proteínas precipitadas se utiliza un micrométodo de FOLIN-CROCALTEU (5), calibrado frente al micro-kjeldahl.

El hierro sérico se determina por medio del α - α' -dipiridilo según RAMSAY (22). El contenido en transferrina se valora indirectamente al determinar la capacidad total de fijación del hierro que presenta el suero; para ello se utiliza el método de RAMSAY (23) que usa el mismo reactivo, pero previamente se satura el suero con una cantidad en exceso de hierro, y se elimina el excedente con CO₂Mg.

Resultado

Los métodos de inmuno-electroforesis (7) y de doble difusión (13) permiten

TABLA I

Valores medios y sus errores correspondientes al hierro sérico, transferrina y conalbumina en la especie *Gallus domesticus*.

Sexo y edad	N.º ejem- plares	Hierro sérico μgr. Fe%	Conalbumina		Transferrina		Capacidad transporte total (Co-Tr) μgr. Fe%
			gr. %	μgr. Fe%	gr. %	μgr. Fe%	
Hembras							
2 1/2 meses	7	115	0,54 ± 0,05	782 ± 60	0,09	112	894
6 meses P	3	600	0,89 ± 0,05	1250 ± 98	0,19	240	1490
6 meses NP	3	200	0,24 ± 0,19	356 ± 93	0,19	247	603
7 meses P	5	575	0,71	1030	0,25	315	1345
7 meses NP	5	185	0,66	960	0,18	225	1185
9 meses P	4	451	1,00 ± 0,15	1440 ± 240	0,27	337	1777
9 meses NP	4	185	0,46 ± 0,03	670 ± 30	0,24	307	977
10 meses P	5	615	1,10	1600	0,25	315	1915
10 meses NP	5	210	0,70	1020	0,17	217	1237
17 meses P	4	555	0,78 ± 0,02	1112 ± 100	0,24	307	1419
17 meses NP	4	170	0,67 ± 0,1	978	0,26	330	1038
2 años	6	373 ± 37	0,19 ± 0,03	280 ± 42	0,29 ± 0,02	378 ± 11	658
Machos							
3 meses	8	104 ± 15	0,14 ± 0,03	215 ± 14	0,1 ± 0,08	137 ± 8	352
18 meses	3	125	0,15 ± 0,01	220 ± 6	0,26	330	550

Los errores no constan en las valoraciones realizadas en una mezcla de varios sueros.

* P = en puesta.

NP = no en puesta.

demostrar la presencia de conalbúmina en el suero de esta especie sin distinción de sexos.

La determinación cuantitativa de la

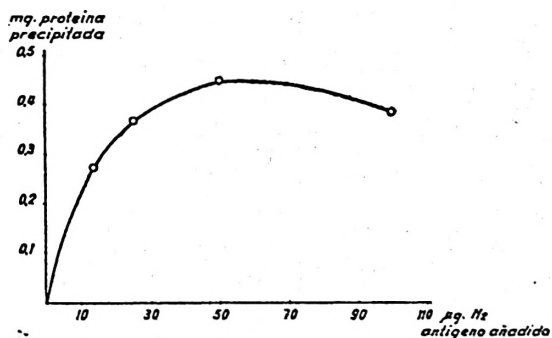


FIG. 1. Curva patrón de la valoración inmunológica de la conalbúmina sérica correspondiente a uno de los inmunosueros empleados.

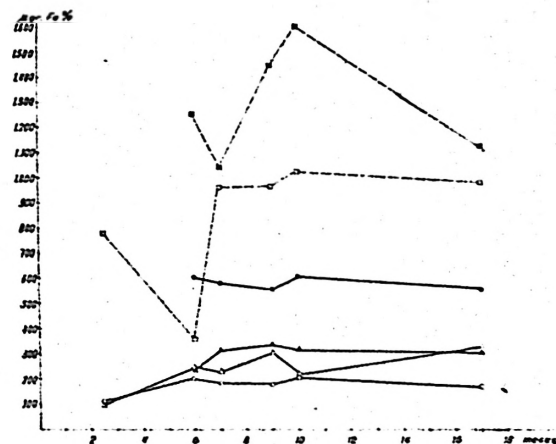


FIG. 2. Variaciones del hierro sérico (○ ●), transferrina (△ ▲) y conalbumina (□ ■) en relación con la edad, en las gallinas no en puesta (signos en blanco) y en puesta (signos en negro).

TABLA II

Datos correspondientes a la titulación inmunológica de un inmonosero (número 3).

Antígeno añadido (µgr. N ₁)	Proteína precipitada (mgr.)	Contenido en anticuerpo (mgr.)	Relación antígeno/anticuerpo	Zonas de la curva
12,5	0,27	0,262	21	Exceso anticuerpo
25	0,37	0,345	13,7	idem
50	0,46	0,41	8,2	Zona equivalencia
100	0,39	—	—	Exceso antígeno

conalbúmina, realizado según el método descrito por KABAT y MAYER (9), se lleva a cabo en diferentes lotes de ejemplares, agrupados según sexo y edad. Los resultados medios obtenidos pueden apreciarse en la tabla I, en donde constan igualmente los valores correspondientes al hierro sérico y contenido en transferrina, así como el valor global de la capacidad de transporte del suero. En la figura 2 pueden apreciarse las variaciones de estos valores en los ejemplares estudiados (hembras en puesta y no en puesta).

En los histogramas de la figura 3 se resumen los distintos valores encontrados, a fin de llevar a cabo una mejor comparación entre machos y hembras, y dentro de ellas comprobar el efecto de la puesta.

Discusión

La conalbúmina ha sido ya indicada por uno de nosotros (17) como el más probable auxiliar de la transferrina en el transporte del hierro sérico en la gallina durante la puesta.

Su contenido en el suero varía con el sexo y la edad, siendo muy superior en las hembras que en los machos. En las hembras, a igual edad, es siempre muy superior en los ejemplares en puesta. Se aprecia una cierta oscilación del contenido de la conalbúmina con la edad, de la cual cabe destacar la presencia de un

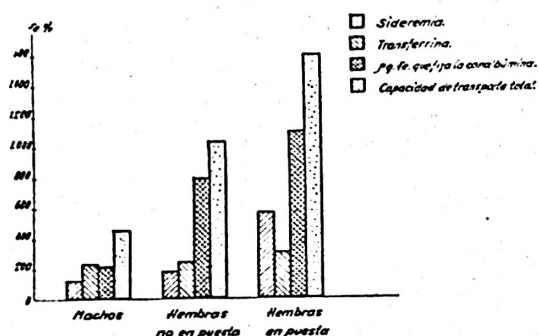


FIG. 3. Histogramas comparativos referentes al hierro sérico y a su capacidad de transporte en la especie estudiada.

máximo durante el 9.º y 10.º mes, que coincide con la época de mayor puesta. Igualmente se comprueba como en las gallinas viejas (2 años) presentan los valores más bajos. Parece, pues, evidente una correlación entre el contenido en conalbúmina sérica, el sexo y el fenómeno de la puesta.

Los valores de hierro sérico y de transferrina hallados en los mismos lotes de ejemplares concuerdan con estudios anteriores (17) demostrándose nuevamente que la aplicación de los métodos de RAMSAY (22, 23) permiten observar la inversión paradójica entre los valores de hierro sérico y transferrina en las gallinas en puesta.

En el presente estudio, la valoración simultánea de la conalbúmina, hierro sérico y transferrina en los mismos sue-

ros, muestran una explicación a tal inversión, pues la conalbúmina se halla siempre en concentraciones más que suficientes para transportar el hierro excedente a la capacidad de la transferrina. En la figura 3 se da una visión de conjunto sobre el transporte del hierro en esta especie; en ella se aprecia el notable incremento de la conalbúmina sérica en las hembras, especialmente en puesta, lo cual determina un aumento de la capacidad de transporte total que es suficiente para atender a una demanda doble en este metal. La conalbúmina representa, por término medio en esta especie, un 73 % de la capacidad de transporte global del suero.

MARSHALL y DEUTSCH (12) han sido los primeros en atribuir a la conalbúmina sérica en la gallina un posible papel en el transporte del hierro, pero su enfoque y conclusión son inversos a los nuestros. Consideran que la cantidad de conalbúmina encontrada explica sólo un 50 % de la capacidad de transporte del suero y no hacen referencia a la posible colaboración entre la conalbúmina y la transferrina. Estos autores valoran inmunológicamente el contenido en 3 ejemplares, y hallan 0,17 gr. % en un macho y en una hembra en puesta, y 0,10 gr. % en la hembra no en puesta.

Por el contrario, nuestra hipótesis es que la gallina en puesta presenta un incremento notable en el metabolismo del hierro, lo cual determina unas necesidades en este metal que superan la capacidad de fijación de la transferrina. La conalbúmina surge entonces como un mecanismo auxiliar de transporte, supliendo las deficiencias de la transferrina y evitando, con ello, la toxicidad del hierro en su forma iónica.

Se ha comprobado que en la gallina en puesta la transferrina está totalmente saturada, pues se han obtenido capacidades latentes de fijación por distintos métodos que han dado resultados nulos; por otra parte aparecen valores positi-

vos en las hembras no en puesta y en los machos (24).

La inversión de los valores de hierro sérico y capacidad total de fijación resulta difícil de comprender si se desconocen los métodos aplicados. Se ha observado (17, 18, 19), tanto en la gallina como en el pato, que la determinación del hierro sérico en ejemplares en puesta, realizadas en sueros tratados previamente con CO_2Mg en polvo, daban valores iguales a los obtenidos en las mismas muestras para la capacidad total de fijación.

En el presente trabajo se ha estudiado directamente este problema en soluciones de conalbúmina con adición de hierro y se ha comprobado en todos los casos que el CO_2Mg absorbe totalmente el hierro que se halla en forma de complejo conalbúmina-Fe.

Los resultados suministran una base numérica a una idea ya apuntada (17, 19) respecto al mecanismo de transporte del hierro en la gallina en puesta. La presencia de dos fracciones encargadas del mismo: a) la transferrina que fija firmemente el hierro y cuya capacidad de fijación se muestra saturada en las aves en puesta, y b) una segunda fracción, la conalbúmina, cuyas concentraciones varían según las necesidades del individuo, y el hierro que transporta es absorbido por el CO_2Mg .

El análisis autorradiográfico de la electroforesis en papel del suero con adición in vitro de Fe-59 (16), muestra radiactividad en todas las fracciones globulínicas. Estudios similares realizados por BARBER y SHEELER (2) en electroforesis en gel de almidón a pH 7, señalan la presencia de Fe-59 únicamente al nivel de la fracción beta, mientras que a pH 5 aparecen dos fracciones portadoras del hierro.

Por otra parte, la inyección en la gallina de una cantidad de Fe que no supere a la capacidad de fijación de la transferrina circulante, determina la aparición

de una banda única al nivel de beta-globulinas (16).

Igualmente hemos comprobado que la conalbúmina posee una movilidad electroforética en gel de agar a pH 8,2 que es intermedia entre la beta-1 y la beta-2-globulina, como ya había sido citado anteriormente (10).

El estado actual de nuestro conocimiento sobre este problema, hace interesante un análisis más detallado con hierro radiactivo para precisar estos extremos.

La valoración inmunológica de la conalbúmina ha obligado la obtención y titulación de distintos inmunoseros anti-conalbúmina en conejos. Se ha comprobado que los puntos de equivalencia entre las diferentes curvas obtenidas corresponden a concentraciones de antígeno de 25 a 100 μ gr. nitrógeno; las relaciones antígeno/anticuerpo en dicho punto oscilan entre 5,2 y 11,8. En la tabla II se indican los datos inmunológicos correspondientes a uno de los inmunoseros. Los valores encontrados por nosotros, en distintos casos, son próximos a los citados en la bibliografía sobre el sistema conalbúmina/anticonalbúmina (9, 12, 27).

Resumen

En el presente trabajo se estudia el contenido en hierro sérico, transferrina y conalbúmina en el suero de distintos ejemplares de la especie *Gallus domesticus*, a fin de esclarecer el mecanismo de transporte del hierro en el suero.

Se analizan diferentes lotes de aves con separación de sexos, edad e indicación de la puesta.

Se confirma con una amplia base numérica la posible intervención de la conalbúmina en el transporte del hierro sérico en la gallina como un elemento auxiliar de la transferrina durante la puesta.

Summary

Conalbumin and the transport of serum iron in birds.

1. Study in the hen (*Gallus domesticus*)

A study has been made of the content of serum iron, transferrin and conalbumin in the serum of the species *Gallus domesticus*, with a view to explaining the mechanism of iron transport in the serum.

Analyses have been made of different groups of birds, separated according to sex, age and laying indications.

Confirmation has been found, based on large numbers, of the possible intervention of conalbumin in the transport of serum iron in the hen as auxiliary element of transferrin during the laying period.

Bibliografía

- (1) ALDERTON, G., WARD, W. H. y FEVOLD, H. L. — *Arch. Biochem.*, **11**, 9-13, 1946.
- (2) BARBER, A. A. y SHEELER, P. — *Comp. Biochem. Physiol.*, **2**, 233-240, 1961. *Ibid*, **8**, 115-122, 1963.
- (3) CLARK, J. R., OSUGA, D. y FEENEY, R. E. *J. Biol. Chem.*, **238**, 3621-3631, 1963.
- (4) FEENEY, R. E., ANDERSON, J. S., AZARI, P. R., BENNET, N. y RHODES, M. B. — *J. Biol. Chem.*, **235**, 2307-2311, 1960.
- (5) FOLIN, O. y CIOCALTEU, V. — *J. Biol. Chem.*, **73**, 627, 1927. Citado por KABAT y MAYER.
- (6) FULLER, R. A. y BRIGGS, D. R. — *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5253-5257, 1956.
- (7) GRABAR, P. y BURTIN, P. — *Analyse Immuno-Electrophorétique*. — Ed. Masson & Cie., París, 1960, pp. 5-31.
- (8) HALKETT, J. A. E., PETERS, TH. y ROSS, J. R. — *J. Biol. Chem.*, **231**, 187-199, 1958.
- (9) KABAT, E. A. y MAYER, M. M. — *Experimental Immunochemistry*. — Ed. C. Thomas, Springfield, 1954, pp. 22-96.
- (10) KAMINSKI, M. y DURIEUX, J. — *Exp. Cell. Research*, **10**, 590-618, 1956.
- (11) LAURELL, C. B. — Serumproteine und Eisentransport, en «Eisenstoffwechsel»

- Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1959, pp. 103-111.
- (12) MARSHALL, M. E. y DEUTSCH, H. F. — *J. Biol. Chem.*, **189**, 1-9, 1951.
- (13) OUCHTERLONY, O. — *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **32**, 231-240 1953.
- (14) PLANAS, J. — *R. esp. Fisiol.*, **16**, 33-38, 1960.
- (15) PLANAS, J. y DE CASTRO, S. — *Nature (Lond.)*, **187**, 1126-1127, 1960.
- (16) PLANAS, J. y CASTRO, S. — *R. esp. Fisiol.*, **16**, 277-288, 1960.
- (17) PLANAS, J. y CASTRO, S. — *R. esp. Fisiol.*, **16**, 197-205, 1960.
- (18) PLANAS, J. y RECIO, J. M. — *R. esp. Fisiol.*, **16**, 265-276, 1960.
- (19) PLANAS, J., RECIO, J. M. y CASTRO, S. — *Nature (Lond.)*, **189**, 668-669, 1961.
- (20) PLANAS, J. y COCHO, D. — *R. esp. Fisiol.*, **18**, 115-118, 1962.
- (21) RAMSAY, W. N. M. y CAMPBELL, R. R. — *Biochem. J.*, **58**, 313, 1954.
- (22) RAMSAY, W. N. M. — *Clin. Chim. Acta*, **2**, 214, 1957.
- (23) RAMSAY, W. N. M. — *Clin. Chim. Acta*, **2**, 221-226, 1957.
- (24) RODRÍGUEZ, R. y PLANAS, J. — *R. esp. Fisiol.*, **20**, 83-87, 1964.
- (25) SHADE, A. L. y CAROLINA, L. — *Science*, **100**, 14-15, 1944.
- (26) WARNER, R. C. y WEBER, I. — *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 5094-5101, 1953.
- (27) WETTER, L. R., COHN, M. y DEUTSCH, H. F. — *J. Immunol.*, **70**, 507-513, 1953.
- (28) WILLIAMS, J. — *Biochem. J.*, **83**, 355-364, 1962.

