

Diferencias apreciadas mediante electroforesis de poliacrilamida en los holoproteidos, glucidoproteidos y lipidoproteidos séricos y en los holoproteidos de cerebro de varias especies de mamíferos *

J. A. Cabezas, M. T. Agapito, J. Antuña, M. P. García, C. Labrador y M. Montañés

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad de Salamanca
(España)

(Recibido el 6 de abril de 1972)

J. A. CABEZAS, M. T. AGAPITO, J. ANTUÑA, M. P. GARCIA, C. LABRADOR and M. MONTAÑÉS. *Differences in Proteins, Glycoproteins and Lipoproteins of Serum, and in Brain Proteins from Several Mammal Species, Observed by Disc Electrophoresis in Polyacrylamide Gel.* R. esp. Fisiol., 28, 179-188. 1972.

A comparative study is made on serum from sheep, cow, pig, horse, ass, mule and in some cases, rat, hamster and rabbit. It shows different patterns according to the species for proteins and glycoproteins when separated by disc electrophoresis in polyacrylamide gel; some differences are also observed for lipoproteins when strips of cellulose acetate electrophoresis are employed. Brain proteins of the above-mentioned species submitted to disc electrophoresis give some bands different between them in number and intensity.

In contrast with human serum which possess a polymorphism due to the haptoglobins types, in the above-named species this polymorphism has not been found.

The importance of disc electrophoresis as a tool to help the resolution of some taxonomical problems is discussed.

Los métodos inmunológicos han prestado desde comienzos de este siglo una valiosa ayuda en la resolución de problemas taxonómicos. Las técnicas electroforéticas tradicionales, aunque aplicadas preferentemente a la especie humana con una fina-

lidad clínica, han permitido registrar diferencias en los valores de las principales fracciones plasmáticas (albúmina, globulinas α_1 , α_2 , β , γ y fibrinógeno) según las especies, disponiéndose actualmente de tablas (5, 7) donde se recogen las cifras correspondientes a estas fracciones de un cierto número de especies de mamíferos y de algunas de aves y peces.

Teniendo en cuenta las extraordinarias ventajas de la electroforesis en disco de

* Trabajo realizado mediante la Ayuda para el «Fomento de la Investigación en la Universidad» concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia a este Departamento.

gel de poliacrilamida (sensibilidad, capacidad de resolución, rapidez), nos ha parecido conveniente aplicar dicho método al estudio comparativo de los holoproteidos, glucidoproteidos y lipidoproteidos procedentes de sueros de algunas especies de mamíferos, próximas entre sí desde el punto de vista taxonómico en ciertos casos, y a los holoproteidos de cerebro de las mismas especies. También la modalidad electroforética con acetato de celulosa gelatinizada fue empleada para el estudio de los holoproteidos y lipidoproteidos séricos, dada su sencillez.

Material y métodos

Las muestras de sueros de las especies ovina, bovina, porcina, asnal, caballo y mular se obtuvieron generalmente por punción de la yugular; al igual que las de cerebro, proceden del Matadero de Salamanca. A veces se usaron además muestras de cabra, rata blanca, hamster dorado y conejo. Como referencia se empleó suero humano normal. En todos los casos estos materiales se manipularon inmediatamente después de su obtención.

Para la electroforesis en gel de poliacrilamida de los holo- y glucidoproteidos se siguió el procedimiento de DAVIS (4) con algunas modificaciones indicadas en otra publicación (10). La electroforesis en acetato de celulosa gelatinizada («cellogel») para los holoproteidos séricos se hizo con tiras de 2.5×17 cm, durante 35 min a 200 vol, empleando negro de amido como revelador; los lipidoproteidos séricos fueron separados también con «cellogel», en las mismas condiciones anteriores, usando como revelador negro sudán B, y siguiendo esencialmente el procedimiento indicado por COLFS (3).

Recogidas las muestras de cerebro inmediatamente después del sacrificio de los animales, se hizo una homogeneización con acetona (1:3, p/v), para delipidar, durante 15 min; después de centrifugar, se decantó y recogió el sedimento. Las pro-

teínas hidrosolubles se extrajeron mediante agitación con agua (1:2, p/v), durante 20 min; se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 5 min y se separó el sobrenadante (fracción A). El residuo se trató con disolución de ClNa al 10 % (1:2, p/v); se agitó, centrifugó y recogió el sobrenadante, como en el caso anterior (fracción B).

La determinación cuantitativa de proteínas se hizo generalmente por el método de LOWRY (8).

En todos los casos, los respectivos análisis electroforéticos se procuraron hacer en condiciones idénticas, a lo menos para cada serie, empleándose frecuentemente seis ejemplares distintos de cada especie y como mínimo tres.

Resultados

Holoproteidos séricos. La figura 1 (A, B, C) corresponde a proteinogramas en disco realizados con muestras de sueros procedentes de tres ejemplares en cada caso, pertenecientes a las especies ovina, bovina y porcina. En todas ellas puede observarse la coincidencia en el número y disposición de las bandas dentro de una misma especie y sus diferencias respecto a las demás especies.

La figura 1 (D) presenta los resultados, repetidamente conseguidos, usando sueros de caballo, asno y mulo. Se aprecia la existencia de algunas diferencias en cuanto al grosor y número de las bandas respectivas.

La figura 1 (E) corresponde a suero de hamster. Obsérvese la distinta distribución de las bandas en comparación con los ensayos anteriores.

La especie humana presenta dentro de ella misma diferencias considerables que corresponden a los tres tipos de haptoglobinas, según se muestra en la figura 2, confirmando resultados anteriores.

Como se observa en la figura 3, la electroforesis de proteínas en tiras de «cellogel» también permite apreciar diferencias en cuanto a posición e intensidad de las

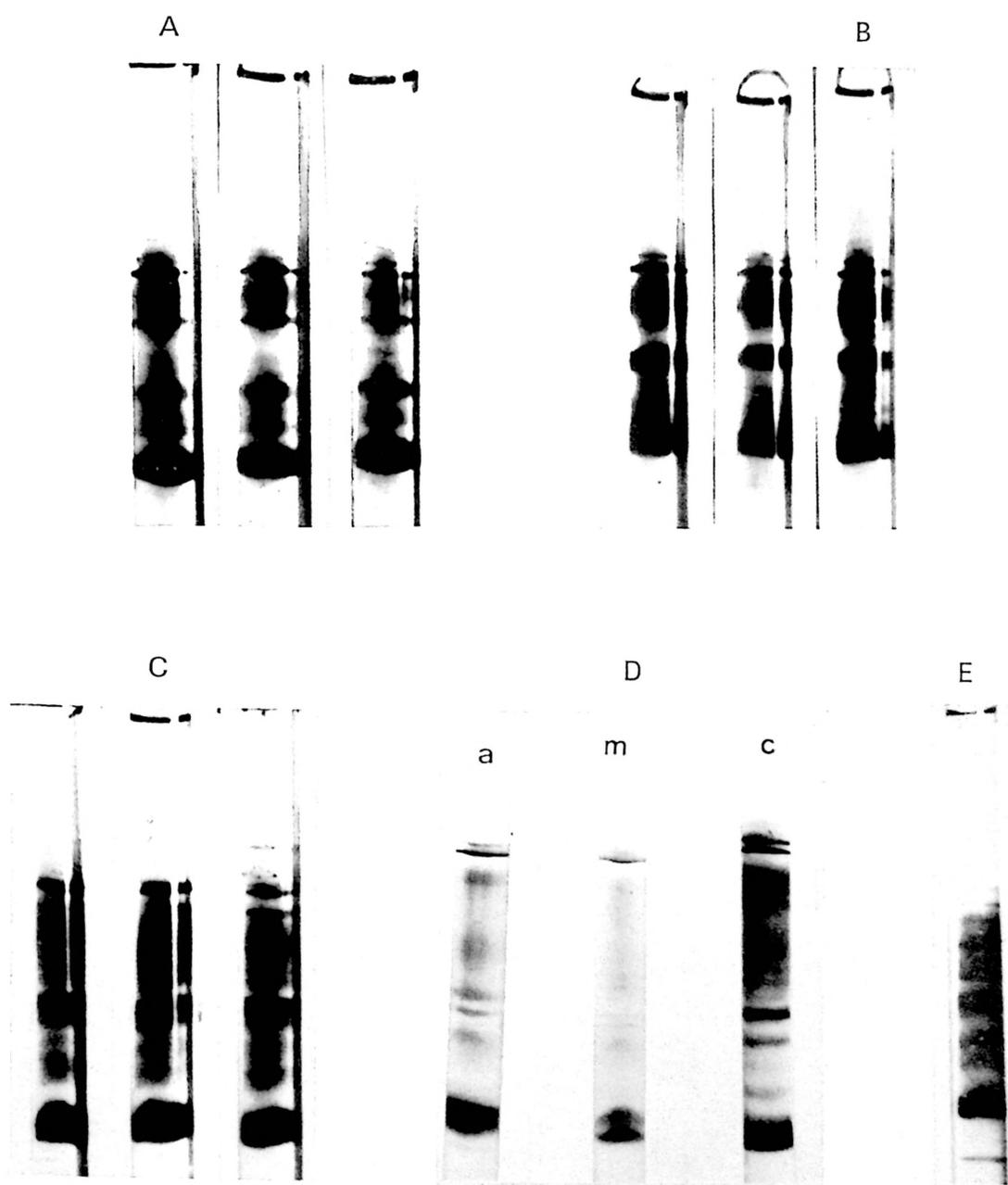


Fig. 1. *Proteinograma en disco, de suero de distintos animales.*
Sueros: A, ovino; B, bovino; C, porcino; D, asnal (a), mular (m), caballar (c); E, hamster.

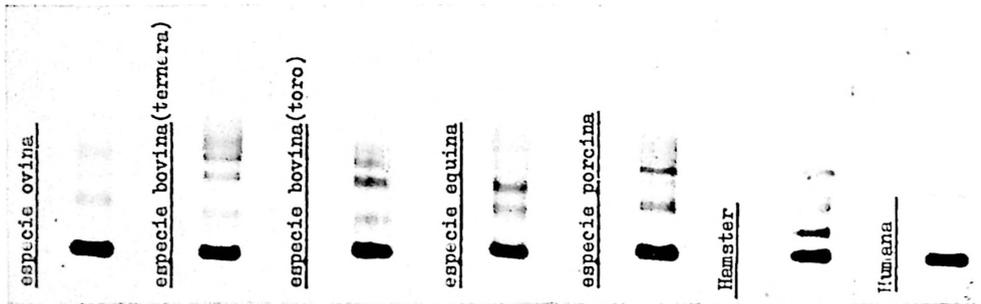


Fig. 3. Proteinograma en «cellogel», de sueros de distintas especies (la banda extrema izquierda corresponde a las albúminas).

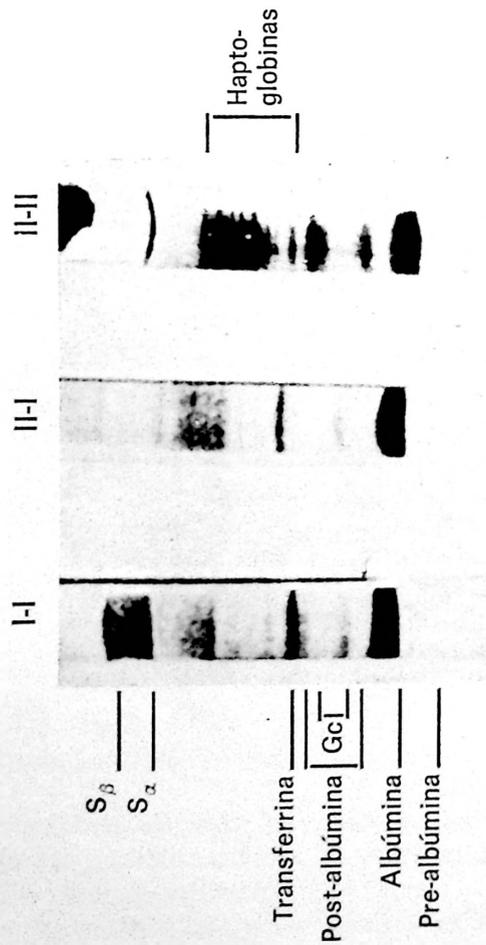


Fig. 2. Patrones de proteinogramas en disco, de suero humano. (Tipos de haptoglobinas: I-I, II-I y II-II, de izquierda a derecha.) S_β = globulina β lenta; S_α = globulina α lenta; Gc = componentes específicos de grupos. (Publicado en R. esp. Fisiol., 26, 335, 1970.)

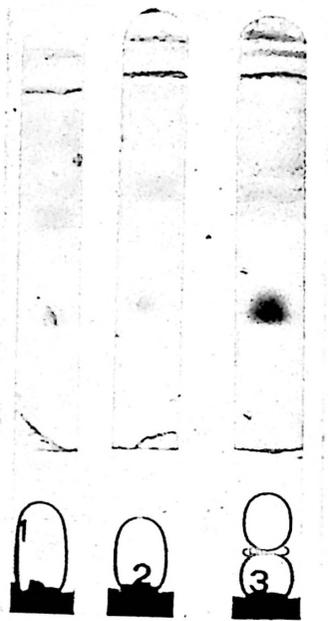


Fig. 4. Glucidograma en disco, de sueros: ovino (1), bovino (2) y porcino (3).

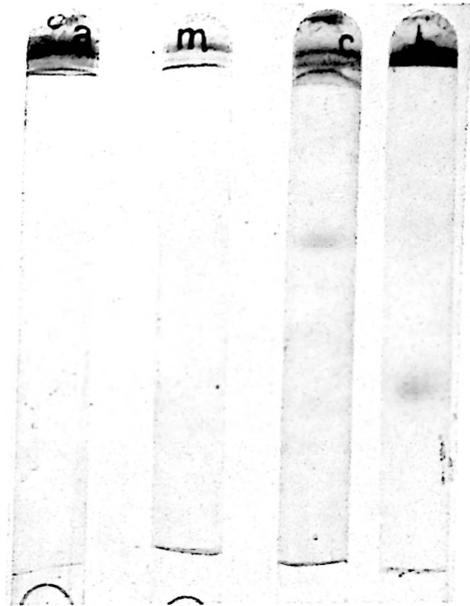


Fig. 5. Glucidograma en disco, de sueros: asnal (a), mular (m), caballar (c) y humano (h).

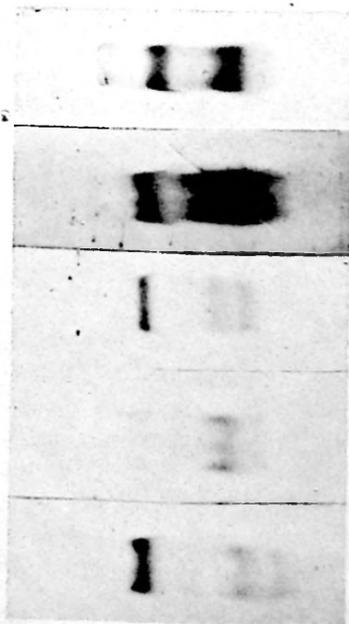


Fig. 6. Lipidograma en «cellogel», de sueros de distintas especies. De arriba abajo: ovino, bovino, porcino, equino y humano. Fracciones de la izquierda: α -lipidoproteidos; de la derecha: β -lipidoproteidos.

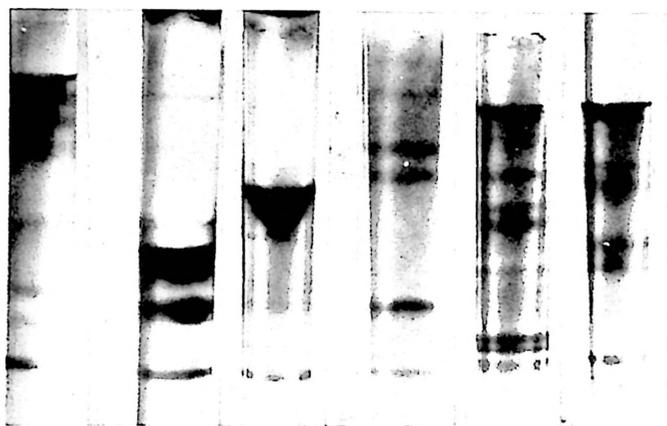


Fig. 7. *Proteinograma en disco, de proteínas de cerebro (fracción soluble en agua) de: cordero, ternera, cerdo, cabrito, conejo y rata (de izquierda a derecha).*

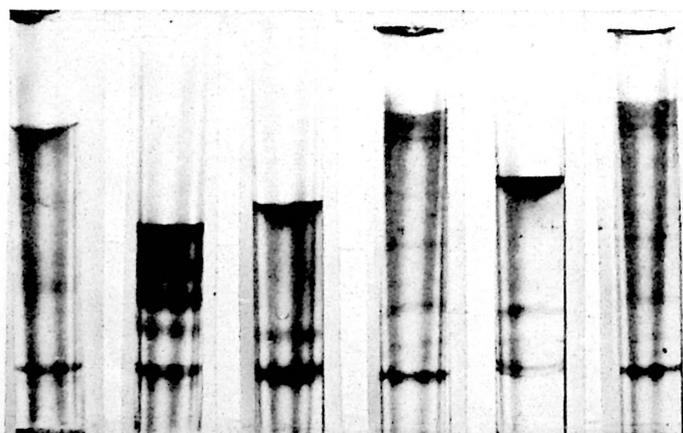


Fig. 8. *Proteinograma en disco, de proteínas de cerebro de la fracción soluble en C1Na al 10 %.*
De izquierda a derecha: cordero, ternera, cerdo, cabrito, conejo y rata.

bandas, aunque éstas sean menos numerosas, correspondientes a los sueros de las especies en ella indicadas. Un análisis cuantitativo, efectuado después de recortar y disolver dichas bandas, confirmó las diferencias; por otra parte, la cifra de proteínas totales varía según las especies.

Glucidoproteidos séricos. Las figuras 4 y 5 recogen comparativamente los resultados obtenidos mediante electroforesis de disco, tiñendo con el reactivo de SCHIFF (10). Las diferencias se acusan sobre todo entre las especies taxonómicamente más alejadas.

Lipidoproteidos séricos. Usando la electroforesis de «cellogel» se confirmó en la especie humana la existencia de cuatro fracciones (pre- α_1 -, α_1 -, α_2 - y β -lipoproteína); en las otras especies se observaron tres bandas bien definidas, encontrándose otra muy tenue en algunos casos (fig. 6). Comparando la intensidad de las bandas respectivas correspondientes a estas especies, se aprecia que hay notables diferencias.

La electroforesis en gel de acrilamida mostró siempre cuatro fracciones, que coincidirían en cuanto a movilidad con la prealbúmina, la postalbúmina, las haptoglobinas y las globulinas de un proteínograma de suero humano efectuado en condiciones paralelas. Pero la resolución conseguida no fue superior a la obtenida con «cellogel».

Holoproteidos de cerebro. La delipidación previa, efectuada con acetona, resultó imprescindible y de mejor resultado que las ensayadas con cloroformo, metanol, mezcla de cloroformo-metanol (2:1, v/v), y tetracloruro de carbono.

La figura 7 corresponde a los proteínogramas de la fracción A (proteínas solubles en agua) y la figura 8 se refiere a la fracción B (proteínas solubles en disolución CINA al 10 %). Se observa que existen diferencias considerables en cuanto a

movilidad e intensidad de las bandas según las especies; el análisis cuantitativo de las principales fracciones, previa elución, siguiendo un procedimiento ya descrito (10), confirmó estas diferencias. Además, la heterogeneidad de estas proteínas cerebrales aparece bien manifiesta. Por su comportamiento electroforético y solubilidad, dichas proteínas podrían ser adscritas a los grupos de albúminas y globulinas.

Discusión

En 1971, RAVEN *et al.* (12) han señalado que el sistema taxonómico todavía en uso ha llegado a describir, desde hace 218 años, sólo del 10 al 15 % de los 10 millones de especies que existen probablemente en el mundo, conociéndose de un porcentaje elevado sólo algunos aspectos morfológicos, y su localización. Consideran que este sistema, apoyado considerablemente en principios que datan de épocas tan lejanas como la del Renacimiento, y desarrollado en el siglo XVIII, es hoy insuficiente. Para perfeccionarlo, se ha acudido últimamente al registro y almacenamiento de datos mediante equipos electrónicos, cuyos datos pueden usarse para muy diversas finalidades, entre ellas para la elaboración de otros sistemas taxonómicos (12).

Es sabido que en la actualidad al conocimiento de las diferencias de tipo morfológico existentes entre las especies puede añadirse el de las de tipo bioquímico. La gran diversidad de proteínas plasmáticas, en el caso de los animales, puede ponerse de manifiesto mediante distintas técnicas, entre ellas la tan sensible de la electroforesis, incluso limitando el uso de ésta a sus modalidades cualitativas.

De los resultados aquí obtenidos parece deducirse que la electroforesis, sobre todo la del gel de poliacrilamida aplicada a proteínas séricas, permite diferenciar especies muy próximas entre sí (asnal, caballo y mular). Constituye una metódica que puede usarse con este objeto, además

de las de gelosa (14), gel de almidón, etc. Recientemente, la electroforesis en gel de acrilamida de las proteínas de la hemolinfa de siete especies de escorpiones ha facilitado la sistemática de estas especies (6). Y en híbridos de aves domésticas, esta electroforesis ha permitido encontrar notables diferencias, especialmente en la fracción de las albúminas plasmáticas (13). Asimismo, la diferenciación de las proteínas de cereales (arroz, centeno, diversas variedades de trigo, etc.) ha sido también estudiada mediante dicho procedimiento (2). Por otra parte, pudiendo efectuarse fácilmente una determinación cuantitativa de cada una de las bandas separadas por electroforesis de disco (10) e incluso una estimación de los pesos moleculares correspondientes a esas fracciones por su movilidad electroforética relativa, se incrementan las ventajas de esta técnica. En cambio, la aplicación de los geles de acrilamida a la separación de lipoproteidos presenta, a lo menos en las condiciones aquí indicadas, algunas limitaciones, que ya habían sido señaladas por otros autores (11).

Exceptuada la especie humana (fig. 2), la constancia en obtener foregramas idénticos usando numerosos ejemplares distintos de una misma especie sugiere, entre otros aspectos, la existencia de tipos únicos para los proteidos respectivos de cada especie; es decir, no existiría el polimorfismo en cuanto a haptoglobinas u otras proteínas, sino que las especies animales aquí estudiadas tendrían un solo tipo de haptoglobinas o carencia de estos glucidoproteidos. Nuestros resultados son confirmativos de los de PLANAS *et al.* (9), quienes habían encontrado en asno, mulo, caballo y cerdo una sola banda de haptoglobina, correspondiente a la I-I humana, mientras que no detectaron ninguna en toro, cordero y cabra, usando electroforesis de gel de almidón. Antes, BLUMBERG (1) había ya demostrado que el polimorfismo de haptoglobinas existente en los sueros humanos no se encontraba ni si-

quiera en otros primates (si bien existe polimorfismo para las transferrinas en los monos, corresponde a proteínas distintas a las del polimorfismo humano) (1).

Resumen

Mediante electroforesis en disco de poliacrilamida y/o electroforesis en acetato de celulosa gelatinizada se ha hecho un estudio comparativo de los holoproteidos, glucidoproteidos y lipoproteidos séricos y de los holoproteidos de cerebro de las especies ovina, bovina, porcina, caballar, asnal y mular; también, en algunos casos, se han analizado muestras de rata blanca, hamster dorado y conejo. Como referencia se ha usado suero humano normal.

Se ha observado que existen diferencias marcadas en cuanto a número de fracciones, movilidad o intensidad de las bandas en el caso de los holoproteidos, sobre todo empleando la técnica electroforética de geles de poliacrilamida, incluso entre especies taxonómicamente muy próximas entre sí (asnal, caballar y su híbrido mular). Las diferencias en los glucidoproteidos, aunque también existentes, son más difíciles de apreciar. Los lipoproteidos son fraccionados con la electroforesis en acetato de celulosa en tres o cuatro bandas distintas según las especies. La electroforesis en acrilamida no dio resultados mejores en este caso.

Mientras que en la especie humana se manifiesta un polimorfismo debido a los tipos de haptoglobinas séricas (I-I, I-II y II-II), en las otras especies antes mencionadas dicho polimorfismo no se ha encontrado, sino que siempre se obtuvieron foregramas idénticos para una misma especie; este resultado concuerda con el de varios autores que han empleado otras técnicas distintas a las de electroforesis en gel de poliacrilamida.

La aplicación de esta modalidad electroforética como criterio bioquímico que puede ayudar a resolver algunos problemas taxonómicos parece quedar confirmada.

Bibliografía

1. BLUMBERG, B. S.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **104**, 25, 1960.
2. CABEZAS, M., NAVARRO, F. y CABEZAS, J. A.: *R. esp. Fisiol.*, **28**, 229, 1972.
3. COLES, B. y VERHEYDEN, J.: *Clin. Chim. Acta*, **18**, 325, 1967.

4. DAVIS, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404, 1964.
5. DITTMER, D. S. (Ed.): *Blood and Other Body Fluids* (Fed. Am. Soc. Exp. Biol.), Washington, 1961, págs. 57-64.
6. LAMY, J., GOYFFON, M., SASSE, M. y VACHON, M.: *Biochimie*, **53**, 249, 1971.
7. LONG, C. (Ed.): *Biochemists' Handbook*, Spon Ltd., London, 1961, p. 841-4.
8. LOWRY, O. H., ROSENDRUCH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J Biol Chem.*, **193**, 265, 1951.
9. NAVARRO, J., ARESO, M. A. y PLANAS, J.: *R. esp. Fisiol.*, **20**, 159, 1964.
10. PORTO, E. y CABEZAS, J. A.: *R. esp. Fisiol.*, **26**, 335, 1970.
11. PRAT, J. P., LAMY, J. N. y WEILL, J. D.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **51**, 1367, 1969.
12. RAVEN, P. H., BERLIN, B. y BREEDLOVE, D. E.: *Science*, **174**, 1210, 1971.
13. SARVELLA, P. y MORRIS, R. S.: *Fed. Proc.*, **30**, 546, 1971.
14. URIEL, J., FINE, J. M., COURCON, J. y LES BOURDELLES, F.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **39**, 1415, 1957.

