

ESTUDIO Y ADECUACION DE LOS METODOS ELECTROFORETICOS EN LA
ONTOGENIA DE LA HEMOGLOBINA FETAL EN OVINOS
I. INVESTIGACIONES EN HEMOGLOBINA FETAL*

(ELECTROPHORETICAL METHODS AND ONTOGENY OF THE FOETAL HAEMOGLOBIN
IN SHEEP. I. A RESEARCH ON FOETAL HAEMOGLOBINS)

por

EMILIO MONGE PACHECO**

El estudio sobre cómo evoluciona la hemoglobina fetal ovina (Hb-F) y el período de tiempo en que desaparece están sujetos a muchas controversias, porque hasta ahora se había trabajado con pocas muestras, dada la dificultad del manejo de gran número de animales recién nacidos y la lentitud en los métodos empleados. Así, Drury y col. (9) afirman que la hemoglobina fetal aparece a los 30 días de edad del animal, mientras que Breathnach y col. (6) y Hammerberg y col. (12) fijan esta edad en 60 días.

En 1939 Adair (1) distinguió la hemoglobina fetal de la materna; hecho confirmado por Jonxis (20), Kendrew y Perutz (24), por medio de los rayos X. Karvonen (21) consiguió separar ambas hemoglobinas. Cabannes y Serain (7) y Harris y Warren (13) lo consiguen mediante técnicas electroforéticas.

La hemoglobina fetal de la oveja se distingue de la hemoglobina adulta por su movilidad electroforética, que presenta a un pH entre 8,5 y 9, situándose en una posición intermedia entre la Hb-A y la Hb-B. Drury y Tucker (10) consiguen desarrollar una técnica electroforética con la cual la Hb-F se sitúa por delante de la Hb-A mediante soluciones tampón de pH 6,5.

La Hb-F está compuesta de dos cadenas α y dos cadenas β , en el período último de gestación. Hasta no hace mucho no había acuerdo sobre el tiempo de aparición de la hemoglobina adulta (Breathnach, (6); Drury y col. (9); Karvonen (22); Kleihaver y col. (25)). El problema fue resuelto en 1972 por Bard y col. (2), con leu-

* Tesis doctoral.

** Sección de Selección Animal. Instituto de Economía y Producciones ganaderas del Ebro. (I.E.P.G.E.) (C.S.I.C.).

Coordinada con el Departamento de Genética y Mejora, Facultad de veterinaria. Zaragoza. Este trabajo se ha realizado gracias a las ayudas recibidas por parte de la Fundación Juan March y de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica.

cina $-C^{14}$. Drury (10) nos dice que la síntesis de Hb-F en condiciones normales termina después del nacimiento. Según los trabajos de Perk y col. (28) los eritrocitos fetales son más resistentes a la fragilidad osmótica.

La transición a hemoglobina adulta ha sido seguida por Riegel (30) y Breathnach (6) método de desnaturalización alcalina); Drury (10) y Monge (27) (métodos electroforéticos); Huisman (18) (cromatografía); y Bard y col (2) (técnicas radioactivas con leucina marcada).

Durante los primeros días después del nacimiento, las cadenas γ de la hemoglobina fetal son reemplazadas por las cadenas β hasta la transformación de toda la hemoglobina, en hemoglobina adulta.

Kazazian (23) estudia la regulación de la producción de la hemoglobina fetal humana y afirma que dos o más *loci* para γ cadenas están ligados a los *loci* de las cadenas δ y β .

Breathnach (6) nos dice que la Hb-F puede ser detectada en la sangre de cordero con una edad de hasta 60 días después del nacimiento, lo será en proporciones minúsculas.

Aparte de su diferente movilidad electroforética, la hemoglobina fetal se ha encontrado que difiere de la hemoglobina adulta en:

Su menor resistencia alcalina (Huisman y col. (18) Van Vliet (33)).

Diferente solubilidad (Karvonen (21, 22); Van Vliet (33); Rapoport y col. (29)).

Efecto Bohr (Bartels (4); Helpert y col. (16); Meschia (26)).

Afinidad por el oxígeno (Barron (3); Dawson y col. (8); Hellegers y col. (15)).

Material y biológico.

Dado los inconvenientes que encontramos en una experiencia preliminar que expresábamos en el resumen de marzo-octubre 1976, nos vimos obligados a formular una nueva experiencia. Se redujo a 7 días el período de tiempo entre las sucesivas extracciones. Aunque inicialmente a todos los corderos recién nacidos se les hacía una toma de muestra, una vez analizado el tipo de su hemoglobina, se seleccionaban únicamente aquellos que daban resultado positivo para la hemoglobinas que tuviera la fracción A (Hb-AA y Hb-AB); así mismo se tomaba igual número de corderos con el fenotipo hemoglobínico BB (Hb-BB), que poseyeran caracteres condicionantes semejantes a los primeros que constituyeron el lote de control.

El hecho de haber seleccionado una serie de corderos de entre el total de los nacidos nos obligó a marcarlos visiblemente para poder diferenciarlos, a fin de no manejar todos los corderos cada semana a lo largo de las 11 extracciones que duró la experiencia (cuadro IV).

Las modificaciones que en la toma de muestras tenían como finalidad el reducir el manejo de los corderos y el *stress* a que se les sometía, y el quedarnos con un número adecuado para los distintos tipos de análisis programados.

Se manejaron 120 animales, de los cuales 75 pertenecen a la raza rasa aragonesa, de la que se seleccionaron 30. De los 45 animales restantes, pertenecientes a la raza merina *Fleischschaf*, se seleccionaron 15 para toma de muestras sucesivas.

Procedimiento tipificado modificado por nosotros, sobre gel de almidón, para estudio de hemoglobinas fetales.

Las separaciones conseguidas entre las hemoglobinas adultas (Hb-AA y Hb-BB), por los procedimientos mencionados en el anterior resumen eran muy pequeñas, lo que presentaba un grave inconveniente a la hora de estudiar la hemoglobina fetal, que se sitúa electroforéticamente entre ambas, por lo que ocasiona fenómenos de solapamiento entre las distintas fracciones que hacen difícil determinar la cantidad y presencia en la muestra de hemoglobina fetal.

El método empleado en el presente trabajo es el de Smithies, citado por Smith (31) pero modificado por nosotros, en las variantes que más tarde se detallan.

El equipo básico utilizado para este procedimiento es el mismo; varía únicamente el de fabricación propia del gel. Las modificaciones realizadas se basan en los experimentos realizados para variar la movilidad electroforética de las distintas hemoglobinas ovinas, por lo cual se investiga:

pH óptimo para el estudio de hemoglobinas ovinas (fig. 1).

Fuerza iónica de la solución tampón, mediante variación de la concentración (fig. 2).

Efecto tamiz del gel, al actuar como filtro molecular (fig. 3).

Los resultados se expresan en el cuadro I.

La solución tampón, para fabricación del gel y llenado de los compartimentos de las cubetas electroforéticas, se prepara concentrada, con lo que se simplifica el método. Su composición química es la siguiente (en moles/litro):

Acido bórico ($H_3 BO_3$)	0,90M
Tris (hidroximetil-aminometano) ($C_4 H_{11} NO_3$)	0,02M
Acido etilendiaminotetracético (sal sódica) ($CH_2,COOH$). $CH_2 COONa$) ₂ 2 H O	0,50M
pH = 8,6	

Esta solución se diluye de 1 a 125 con agua destilada, para la fabricación del gel; y de 1 a 7, para las cubetas electródicas.

Una vez listo el gel para recibir la muestra, se hace una única incisión paralela al borde menor, quedando el gel dividido en dos porciones, una de 5 cm y la otra de 17 cm. En la línea de división se colocan 11 muestras.

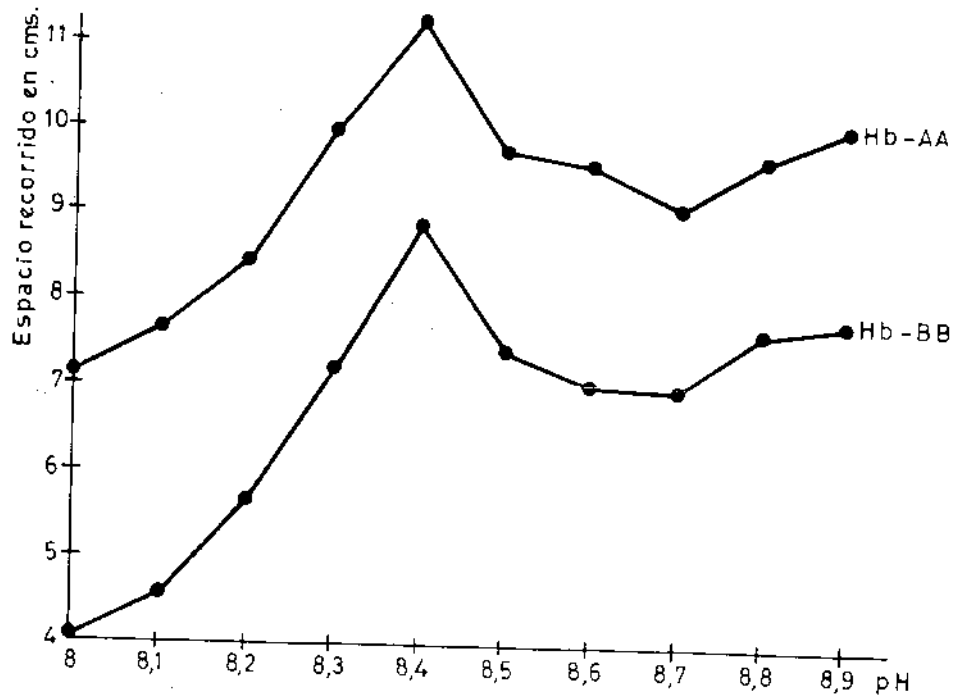


FIGURA 1. Expresión gráfica de la variación del desplazamiento de las hemoglobinas según el pH.

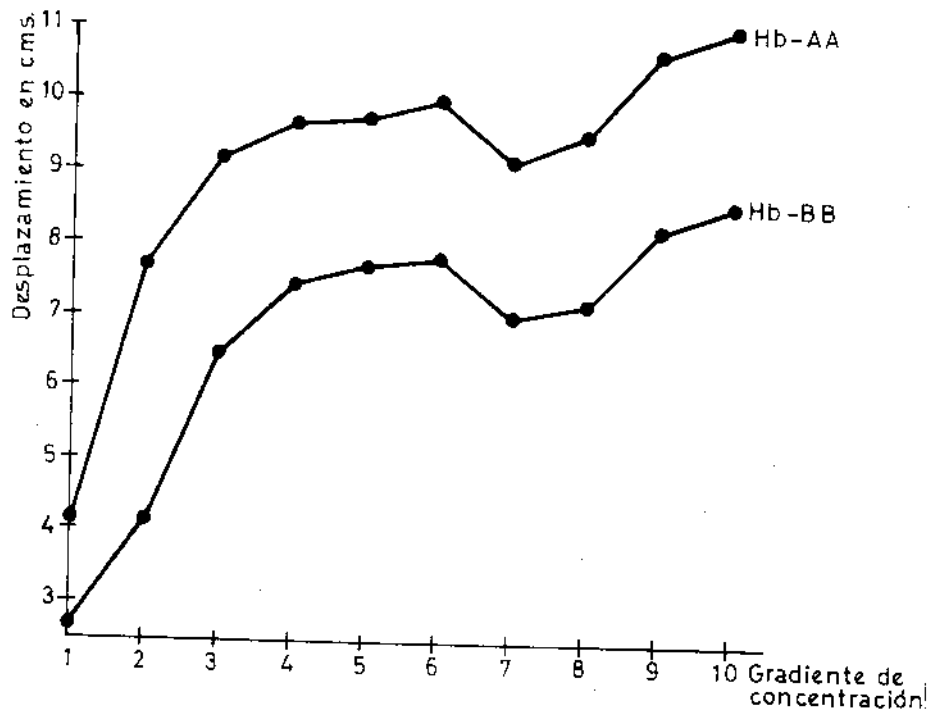


FIGURA 2. Representación gráfica de la variación del desplazamiento según la concentración de la solución matriz.

Una vez dispuesto el gel para el corrido, se conecta la fuente de alimentación de modo que proporcione un potencial de 7 volt/cm en el gel, durante 15 horas. Este potencial se mide mediante un voltímetro adicional que señala la diferencia de potencial entre los extremos del gel.

Corte y teñido del gel.

Finalizado el corrido electroforético y desmontado el molde, se secciona el gel por la mitad, como se ha indicado anteriormente y se procede al teñido.

El método usado para la tinción de las distintas fracciones que aparecen en el corrido es el de la O-Dionisidina según Smith (31), cuya composición es la siguiente:

Solución tampón acético-acetato 1,5M pH = 4,6	35 ml.
Solución de O-Dionisidina (1 g/l de etanol	35 ml.
Agua destilada	80 ml.
Agua oxigenada de 100 vol	ml.

El agua oxigenada se añade en el momento en que se va a utilizar la solución.

Una vez preparado el reactivo se vierte sobre la mitad inferior del gel, procediendo al cabo de 30 segundos al lavado con agua corriente, después del cual se procede a fotografiarlo y se guarda el gel hasta ver el resultado de la fotografía.

Evaluación cuantitativa de las distintas fracciones electroforéticas en las muestras de hemoglobina.

Los métodos de cuantificación de los distintos tipos que hay en una muestra de hemoglobina se basan en dos métodos analíticos como son la cromatografía y la electroforesis, aunque en algunos casos uno sea complementario del otro.

Una vez realizados los corridos electroforéticos, las distintas bandas aparecidas se cuantificaron por el método densitométrico.

Todas las mediciones se realizaron en densitométrico automático de doble haz marca VERNON modelo PHI-3, capacitado para hacer mediciones tanto por transparencia como por reflexión.

Determinación cuantitativa de hemoglobina en sangre.

Los métodos más exactos para determinar la hemoglobina se fundan en la determinación química del contenido en hierro o capacidad de oxígeno, pero requieren una enorme cantidad de tiempo, por lo cual no están muy en uso. Se han desa-

rollado un número de procedimientos rápidos. El más exacto es el método de la cianmetahemoglobina; éste es el seguido por nosotros, recomendado como el más adecuado por el "National Resarch Council", la "American Society of Clinical Chemists" y el "College of American Pathologits".

El método más usado en el presente trabajo es el de la cianmetahemoglobina, que es el recomendado como normal por la National Research Council de la "American Society of Clinical Chemist" and "College of American Pathologist".

El reactivo usado por nosotros es el Drankin modificado, cuya composición es la siguiente:

Ferrocianuro potásico	20 mg.
Cianuro potásico	50 mg.
Agua destilada hasta	1 litro

Esta solución se guardó a temperatura ambiente y en botella pintada de negro, tal como recomienda la técnica. La reacción que se provoca en esta circunstancia es la siguiente: la hemoglobina por medio del ferrocianuro pasa a metahemoglobina, que con el cianuro da cianmetahemoglobina.

La técnica es como a continuación se indica:

1. Disponer de 5 ml del reactivo en un tubo de ensayo.
2. Añadir 0,02 ml de sangre bien mezclada (recogida con un anticoagulante).
3. Aplicar un tapón de goma y agitar por inversión.
4. Dejar en reposo durante 10 minutos.
5. Leer la densidad óptica (D. O.), absorbancia o extinción de esta solución, en tubos calibrados, frente a un blanco. Para esta referencia se usa la solución de reactivo en un espectofotómetro a 540 m μ .
6. Se abre una ampolla patrón de cianmetahemoglobina, que se ha puesto previamente a la temperatura ambiente. Se preparan 6 tubos calibrados, tal y como se indica en el cuadro II.
7. Con los valores hallados se prepara una curva de calibración disponiendo en abscisas las concentraciones y en ordenadas las densidades ópticas.
8. Con ayuda de la curva de calibración se calculan los valores de hemoglobina en la muestra.

Las lecturas que se realizaron en el espectofotómetro fueron en transmitancias (escala 0--100). Se convierten en absorbancias mediante la fórmula:

$$A = 2 \log T$$

A = Absorbancia.

T = Transmitancias.

Modificaciones realizadas en las condiciones de corrido en gel de almidón para el estudio de la hemoglobina fetal.

En las figuras 1, 2 y 3 se señalan las variaciones obtenidas en el desplazamiento electroforético de las hemoglobinas (Hb-AA y Hb-BB) con arreglo a cada uno de los siguientes factores:

Modificación del pH de la solución tampón.

Modificación de la concentración y por consiguiente de la fuerza iónica, en la solución tampón para la obtención del gel.

Modificación en la concentración de almidón para la fabricación del gel, para el estudio de la retención molecular, que ocasiona sobre los distintos tipos de hemoglobina.

La curva que se obtiene (fig. 1) a partir de los resultados acaecidos en la variación del pH, entre un rango de 8.1 a 8.9 en la solución tampón que se usa para la fabricación del gel, nos muestra las modificaciones en la velocidad de migración de dos tipos de hemoglobina (Hb-AA y Hb-BB). Las separaciones obtenidas entre ambas hemoglobinas oscilan entre 2 y 3 cm. Así mismo, se puede observar que a pH bajo, entre dicho rango, las movilidades de estas hemoglobinas son las menores, incrementándose según aumenta el pH.

El pH elegido para las condiciones de trabajo, fue de 8.2, obteniéndose en este punto un equilibrio entre la resolución de las bandas y la separación del corrido. A lo largo de esta experiencia se mantuvieron constantes la concentración de almidón (33 g en 250 ml de solución tampón) y el voltaje entre los extremos del gel (150 voltios).

Con los resultados obtenidos en el apartado referente a la solución tampón se confeccionó la figura 2, en la que puede observarse la variación en la separación entre los dos tipos de hemoglobinas (Hb-AA y Hb-BB), que se consigue al ir incrementando la concentración de la solución tampón constitutiva del gel. El aumento en la concentración y por consiguiente, en la fuerza iónica, se ha conseguido incrementando en 1 ml la cantidad de solución madre necesaria para la obtención de los 250 ml de solución que necesitamos para la fabricación del gel. La experiencia se comenzó con 1 ml de solución matriz diluida a 250 ml con agua destilada, llegando hasta una concentración de 10 ml en 250 ml, obteniendo un gradiente de concentración de solución matriz, que aumenta gradualmente en 1 ml.

Como puede observarse en la figura 2, las migraciones electroforéticas de ambas hemoglobinas son proporcionales a la concentración de la solución, siendo menor a bajas concentraciones. El corrido menor se obtiene en la proporción de 1 ml de solución matriz diluida a 250 ml, correspondiendo el mayor en la concentración 10 a 250 ml. Los resultados obtenidos para la separación entre ambas hemoglobinas se expresan en dicho cuadro, obteniéndose un rango de separación entre 1.5 a 3.5 cm, que corresponde a una disolución de la solución matriz de 2 a 250 ml y, por consiguiente, esta concentración fue la que utilizamos en el presente trabajo.

Para estudiar el efecto de tamiz que produce un incremento en la concentración de almidón se prepararon geles que contenían entre 29 y 37 g en 250 ml de solución, es decir, entre 11,60 y 14,80 p. 100. El gradiente de concentración de almidón se obtuvo incrementando la concentración de almidón en un 0,8 p. 100 (20 g) para cada uno, en la serie de geles.

Los resultados obtenidos se encuentran representados en la figura 3, donde puede observarse el efecto del filtro molecular, resultando prácticamente constante (2,7 cm) la separación entre ambas hemoglobinas (Hb-AA y Hb-BB). La distancia desde el origen a las hemoglobinas respectivas va disminuyendo gradualmente a medida que aumenta la concentración de almidón hasta 35 g, a partir de la cual esta distancia se mantiene constante. Todo esto nos induce a pensar que aunque hay un efecto de retención según se incrementa la concentración de almidón, el tamaño de ambas macromoléculas (Hb-AA y Hb-BB) es el mismo.

A lo largo de estas investigaciones de las tres variables estudiadas se mantuvieron dos de ellas constantes, en cada una de las experiencias, estudiando el efecto que producía, en la movilidad de la proteína, la variación de la tercera.

En el cuadro IV se reflejan los desplazamientos conseguidos por los distintos tipos de hemoglobina, en cuatro geles distintos, fabricados según las condiciones que habíamos considerado más idóneas, investigadas anteriormente y que fueron:

2 ml de la solución matriz diluida a 250 ml con agua destilada.
 pH de la solución tampón para la fabricación: 8,2.
 Concentración de almidón: 29 g en 250 ml de solución.

Los desplazamientos medios obtenidos para cada una de las fracciones de los distintos tipos de hemoglobina fueron:

Para la Hb-AA.	11,88 cm
Para la Hb-F	10,38 cm
Para la Hb-B	8,55 cm

Como la duración del corrido electroforético fue de 15 horas y la diferencia de potencial, entre los extremos del gel, era de 150 voltios, las movilidades absolutas que se obtuvieron fueron:

$$\mu_A = 3,23 \times 10^{-5} \frac{\text{cm}^2}{\text{vol.} \times \text{seg.}}$$

$$\mu_F = 2,82 \times 10^{-2} \frac{\text{cm}^2}{\text{vol.} \times \text{seg.}}$$

$$\mu_B = 2,24 \times 10^{-2} \frac{\text{cm}^2}{\text{vol.} \times \text{seg.}}$$

Tomando la μ_A como unidad, obtenemos las movilidades relativas de las diferentes hemoglobinas.

μ_A	1 cm /vol. \times seg.
μ_F	0,87 cm /vol. \times seg.
μ_B	0,69 cm /vol. \times seg.

Se puede observar que la diferencia entre las movilidades relativas, existente entre la μ_A y μ_F es de 0,13; entre la μ_F y μ_B , de 0,18, lo que representa un incremento de 0,5 unidades entre las diferencias de las respectivas hemoglobinas.

En el cuadro V se reflejan las pruebas realizadas con los distintos colorantes específicos para la tinción de hemoglobinas, siendo el más resolutivo la O-dianisidina, que dió resultados positivos para concentraciones de 13×10^{-6} g/ml, mientras que la O-toluidina y la bencidina a esta dilución son negativos.

Resultados y discusión.

En los animales investigados para la raza rasa aragonesa obtuvimos los valores siguientes (no se han presentado animales con Hb-AA):

Corderos con Hb-AB entre 23,50 y 30,40 días.

Corderos con Hb-BB entre 28,79 y 35,68 días.

Para la otra raza considerada, se obtuvieron los siguientes resultados:

Animales con Hb-AA 20 y 27 días.

Animales con Hb-AB 28,28 y 35,28 días.

Animales con Hb-BB 32 y 39 días.

Como se puede observar, la hemoglobina fetal presenta una mayor velocidad de desaparición en los animales con hemoglobina en heterocigosis (Hb-AB).

Tanto los gráficos como los histogramas se han obtenido poniendo en ordenadas el tanto por ciento de hemoglobina fetal y en abscisas, los días, desde el nacimiento del cordero hasta la desaparición de la hemoglobina fetal.

En la figura 4 se da la curva obtenida para la evolución de la hemoglobina fetal, en la raza rasa aragonesa, y la 5 corresponde a la raza merina Fleischschaf, pudiéndose apreciar la evolución cuantitativa día a día, tanto para los animales con fenotipo hemoglobínico BB, como para los de fenotipo AB. Los corderos con Hb-AA no están representados en estos gráficos, por carecer de un número suficiente de animales.

En la figura 6 se puede comparar la evolución de la hemoglobina fetal en ambas razas y para ambos fenotipos. Los valores medios, para el levantamiento de los puntos de las curvas, se hicieron agrupando los resultados de tres en tres días y hallando

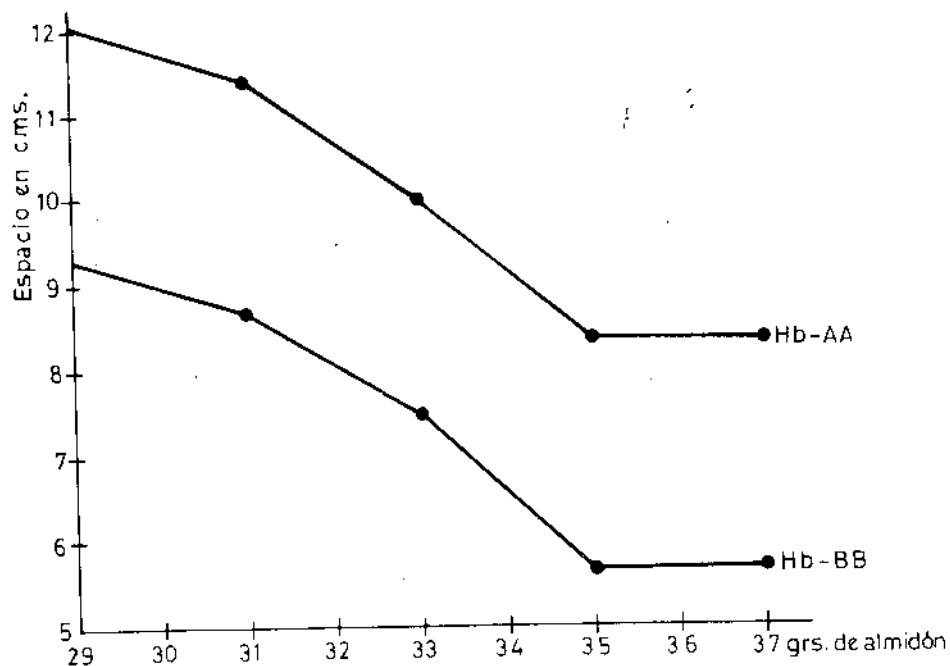


FIGURA 3. Representación del efecto tamiz en la variación del desplazamiento en las hemoglobinas.

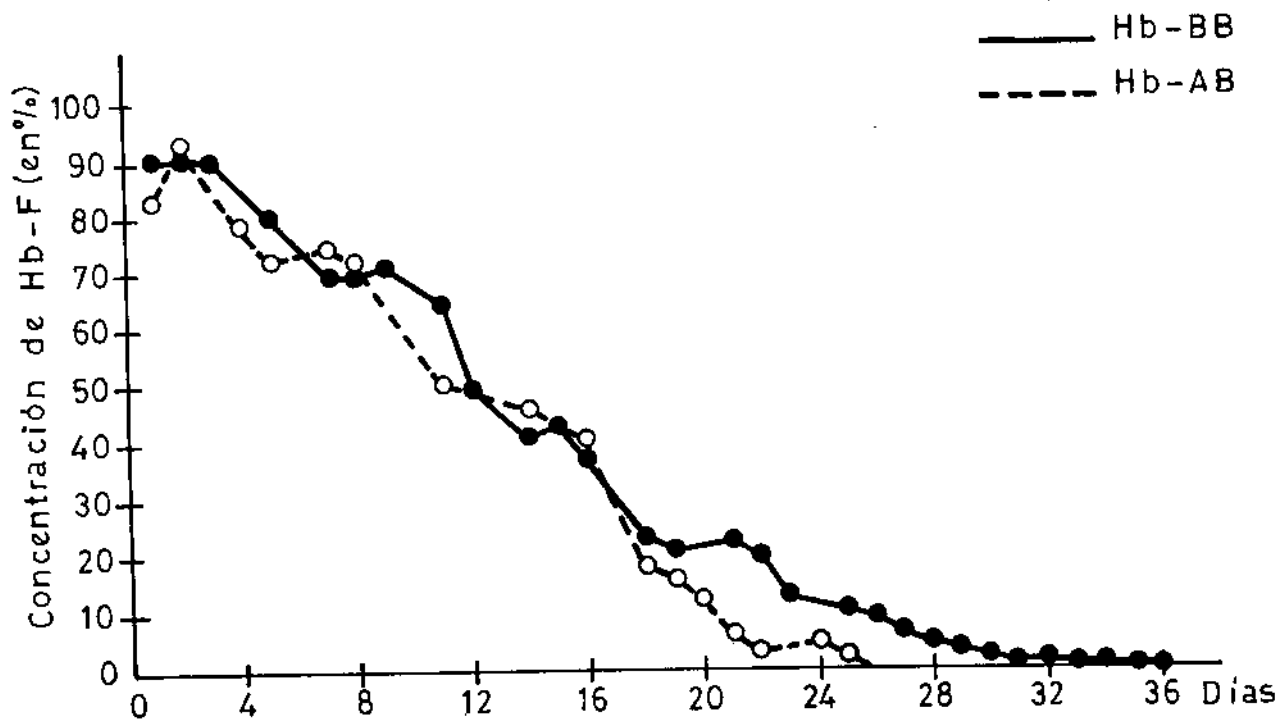


FIGURA 4. Representación gráfica de la evolución de la cantidad de hemoglobina fetal (en p. 100) a lo largo de la experiencia. Raza Rasa Aragonesa.

MONGE: INVESTIGACIONES EN HEMOGLOBINA FETAL.

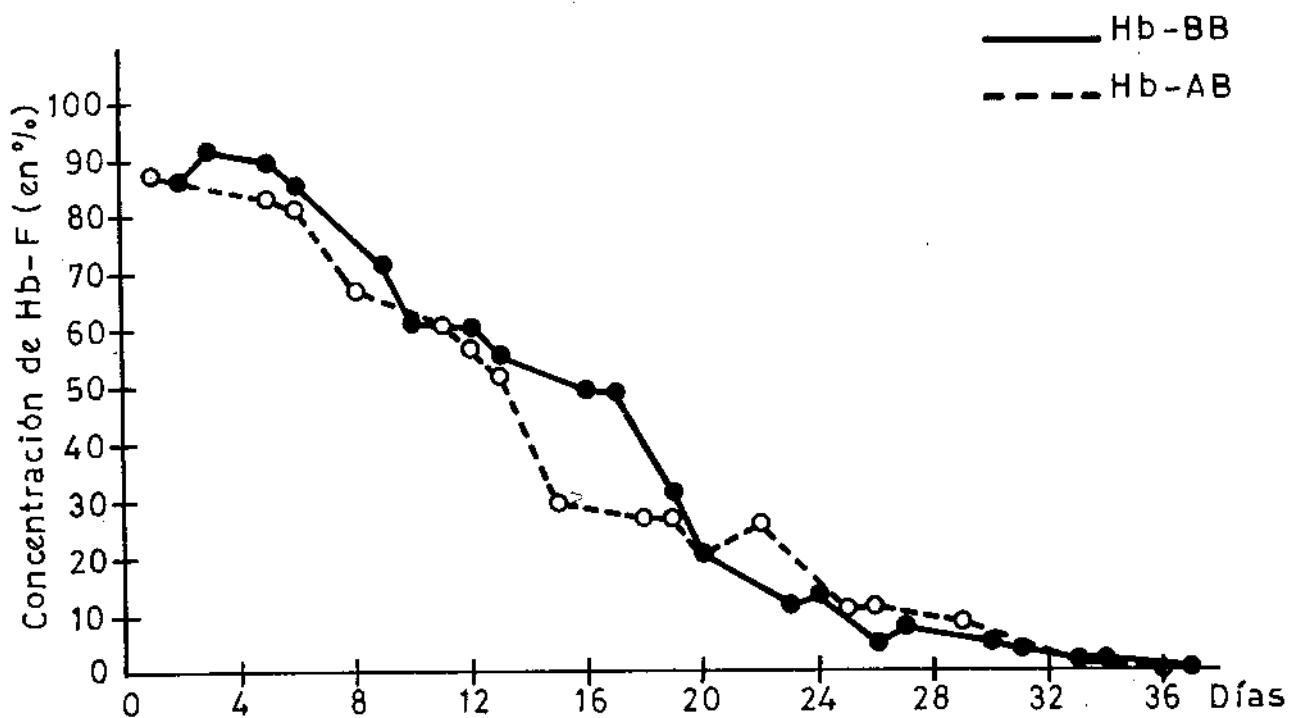


FIGURA 5. Representación gráfica de la evolución de la cantidad de hemoglobina fetal (en p. 100) a lo largo de la experiencia. Raza Merino Fleischschaf.

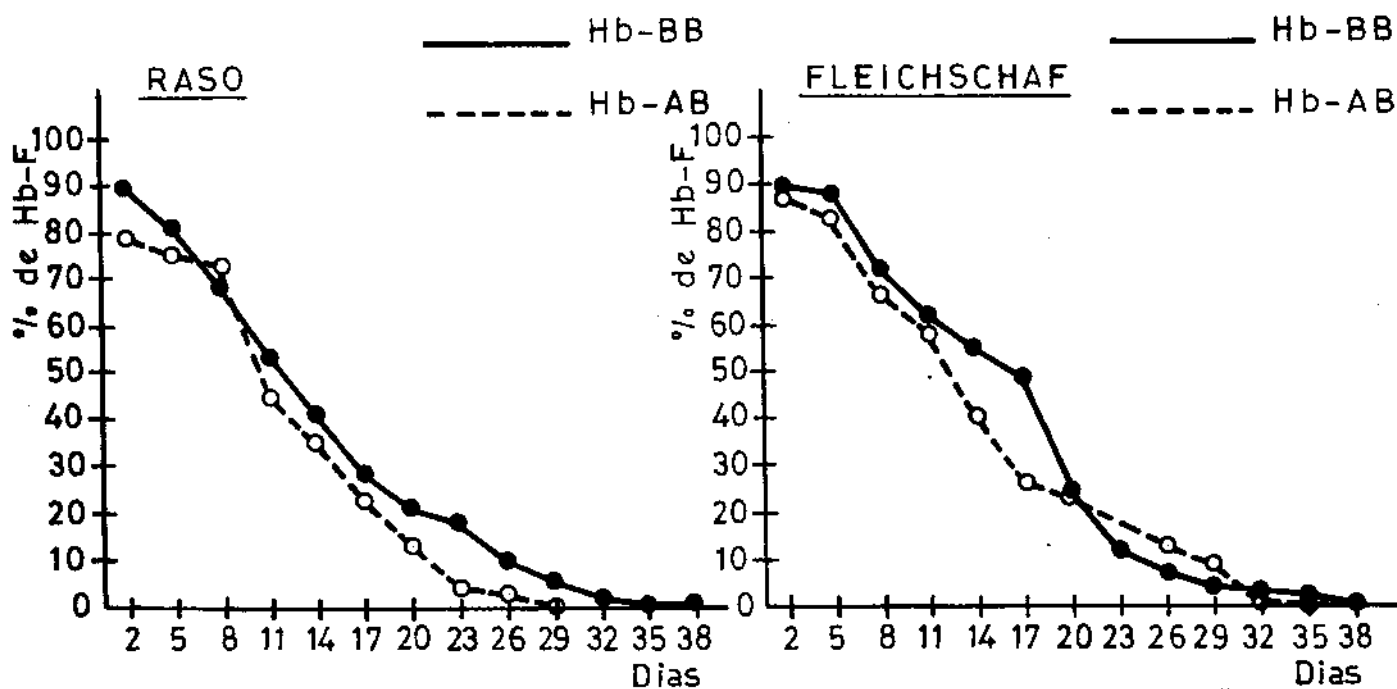


FIGURA 6. Representación gráfica de la evolución de la cantidad de hemoglobina fetal (en p. 100) a lo largo de la experiencia. Datos agrupados en clases (de tres días).

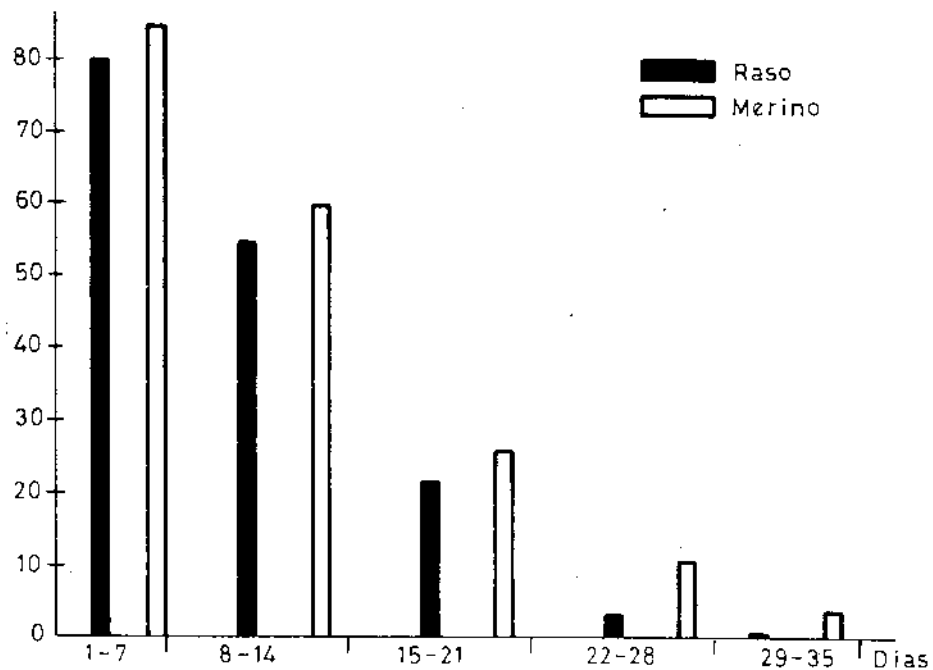


FIGURA 7. Desaparición de la Hb-F en corderos portadores de Hb-AB.

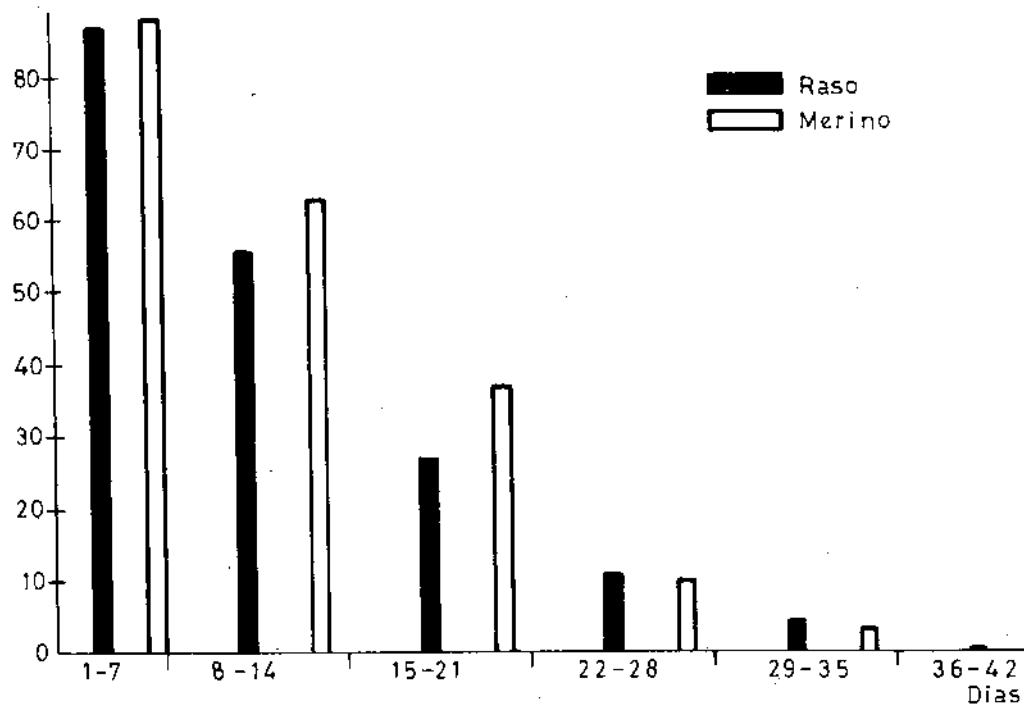


FIGURA 8. Desaparición de la Hb-F en corderos portadores de Hb-BB.

la media, con el fin de evitar los errores que se podrían tener como consecuencia de la apreciación en la edad de los animales, pues aunque se conocía el día del nacimiento, era de forma relativa, pues éste se podría producir después de que los controladores se hubieran ido y por lo tanto se fecharía al día siguiente, con lo cual podría existir una diferencia de hasta 16 horas, desde el nacimiento hasta la hora de toma de muestra. De la gráfica podemos deducir el tanto por ciento de hemoglobina fetal correspondiente a los diferentes días. Así tenemos que el 50 p. 100 de la hemoglobina fetal se produce:

Para animales raso aragoneses con Hb-BB, 12 días.

Para animales raso aragoneses con Hb-AB, 11 días.

Para animales Fleischschaf con Hb-BB, 16 días.

Para animales Fleischschaf con Hb-AB, 13 días.

Se entiende que los resultados están expresados en valores medios.

En las figuras 7 y 8 se compara la evolución de la hemoglobina fetal, para los mismos fenotipos de la hemoglobina fetal, para los mismos fenotipos hemoglobínicos de las dos razas, agrupándose los resultados en intervalos de siete días. La figura 7 corresponde al fenotipo hemoglobínico AB (Hb-AB). Se puede apreciar que en todos los intervalos de tiempo considerado el porcentaje de hemoglobina fetal es mayor en la raza Fleischschaf que en la raza raso aragonesa. En la figura 8 se realiza el mismo estudio que en la anterior, viéndose en el histograma que en el intervalo de 1 a 21 días el porcentaje de hemoglobina fetal es mayor en la raza Fleischschaf, mientras que a partir de dicha edad hay un ligero predominio en el porcentaje de Hb-F en la raza raso aragonesa, pudiéndose apreciar en el último intervalo (36-42 días) que aún hay persistencia de hemoglobina fetal en algunos animales, para dicha raza, mientras que en la Fleischschaf ya no existe.

En las figuras 9 y 10 se compara la evolución de la hemoglobina fetal, según los distintos tipos de hemoglobina (Hb-BB y Hb-AB) dentro de la misma raza. En la figura 10, que corresponde a la raza raso aragonesa, se puede apreciar el mayor porcentaje de Hb-F para los animales que han presentado el tipo de hemoglobina Hb-BB, permaneciendo las diferencias, entre ambos valores, prácticamente constantes. En el intervalo 36-42 días se puede apreciar aún Hb-F para el fenotipo BB, mientras que para el tipo AB ya ha desaparecido. En la figura 10, que corresponde a corderos Fleischschaf, se nota el mayor porcentaje de Hb-F en los animales de fenotipo BB, siendo la diferencia más acusada en el intervalo de 15-21 días a partir del cual el tanto por ciento es prácticamente el mismo para ambos fenotipos hemoglobínicos (Hb-AB y Hb-BB).

Discusión.

Aunque la técnica de gel de almidón la consideramos la más idónea para identificar los distintos tipos de hemoglobina adulta, nos encontramos que al aplicarla a estudios relacionados con la hemoglobina fetal había un efecto de solapamiento

CUADRO I. Resultados de las variaciones obtenidas en el desplazamiento electroforético de las hemoglobinas respecto a los factores que se citan.

Factor modificado	Gradiente de la variación	Distancia recorrida por la Hb-A (cm)	Distancia recorrida por la Hb-B (cm)	Separación obtenida entre Hb-A y Hb-B
Almidón (g en 250 ml)	29	12	9,3	2,7
	31	11,4	8,7	2,7
	33	10	7,5	2,5
	35	8,4	5,7	2,7
	37	8,4	5,7	2,7
pH	8,1	7,1	4,1	3
	8,2	7,6	4,6	3
	8,3	8,4	5,6	2,8
	8,4	9,9	7,1	2,8
	8,5	11,2	8,8	2,4
	8,6	9,7	7,4	2,3
	8,7	9,5	7	2,5
	8,8	9	6,9	2,1
	8,9	9,6	7,6	2
Tampón (ml de sol. matriz a 250 ml)	1	4,7	3,2	1,5
	2	8,2	4,7	3,5
	3	9,6	7	2,6
	4	10,1	7,9	2,2
	5	10,2	8,2	2
	6	10,4	8,3	2,1
	7	9,6	7,5	2,1
	8	10	7,6	2,4
	9	11,1	8,7	2,4
	10	11,5	9,1	2,4

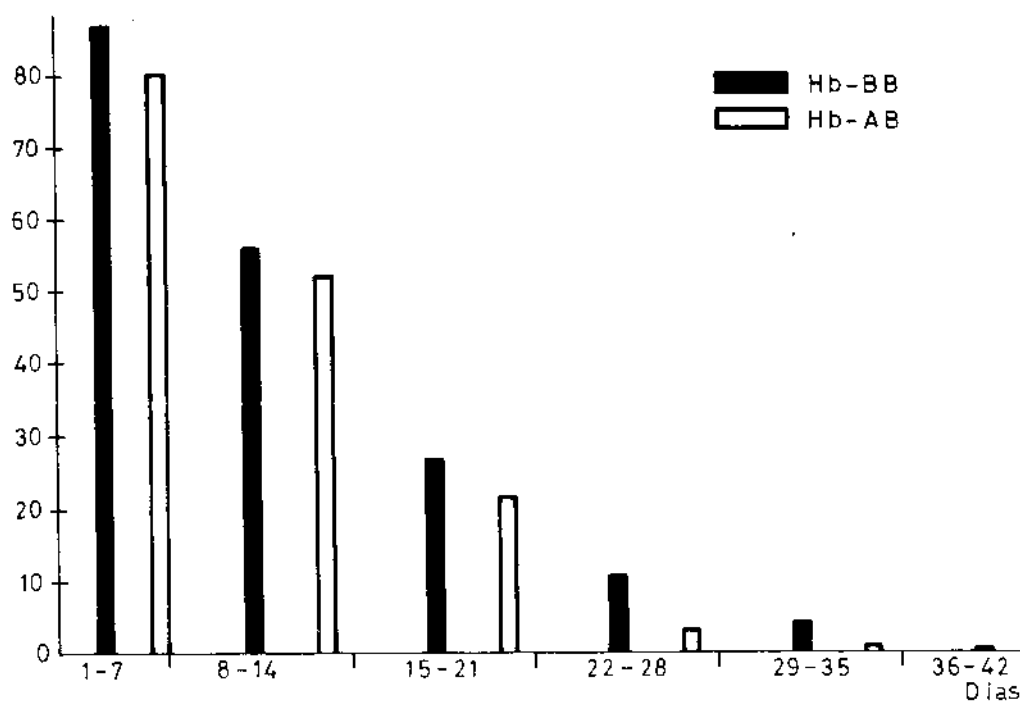


FIGURA 9. Comparación en la raza Rasa de la evolución de la Hb-F con la Hb-BB y la Hb-AB.

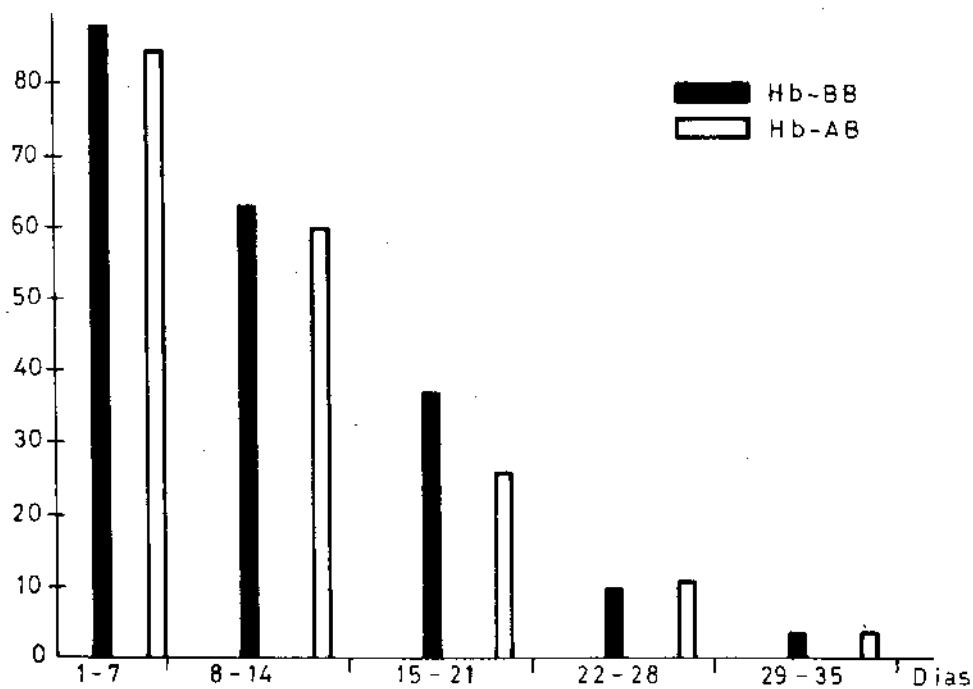


FIGURA 10. Comparación en la raza Merino Fleischschaf de la evolución de la Hb-F en animales con Hb-BB y Hb-AB.

debido a la interacción entre la proteína y el gel, ocasionado por el desplazamiento electroforético de las distintas bandas de las hemoglobinas, lo que implicaba no poder usarlo para los fines que perseguíamos. Este método se utilizó para la selección de los animales sobre los que se iba a estudiar la evolución de la hemoglobina fetal, tanto en el laboratorio como en el campo a la hora de obtener la muestra.

Modificaciones aportadas que anulan los inconvenientes anteriores.

Dada la versatilidad de este medio soporte Braend (5) modificó la técnica de Smithies (32), lo que nos indujo a pensar si la técnica sin modificar sería más ventajosa para nuestros fines, por lo cual comenzamos a estudiarla tal y como Smith (31) la recoge en su libro. Las pruebas realizadas con esta técnica, nos llevaron a mayores separaciones entre las hemoglobinas adultas (Hb-AA y Hb-BB) pero la banda de la hemoglobina fetal seguía manteniéndose muy cercana a la fracción de la Hb-BB. Esto nos indujo a investigar sobre la técnica de Smithies con el fin de adecuarla a las pretensiones del trabajo. Nuestro interés se centraba en obtener la máxima separación posible entre las hemoglobinas adultas, con el fin de que no enmascarasen la fracción de la hemoglobina fetal, que se sitúa electroforéticamente entre la Hb-AA y la Hb-BB, siendo la primera la de mayor desplazamiento y la segunda la de menor.

El problema lo planteamos con vistas a modificar el desplazamiento de las proteínas sometidas a electroforesis. Este desplazamiento se expresa en función de la movilidad de las proteínas bajo la influencia de un campo eléctrico. Por definición, (Hartmann, (14) la movilidad (U) se formula:

$$U = \frac{v}{H}$$

v = velocidad de la proteína (cm/seg.)

H = campo eléctrico (vol/cm).

U = movilidad (cm²/vol. seg.).

El valor de la movilidad está afectado del signo negativo (-) si la proteína se dirige hacia el ánodo; del signo positivo (+), si se orienta hacia el cátodo.

Se expresa en potencia de 10⁻⁵.

Debemos destacar que en los trabajos efectuados no se han tenido en consideración las corrientes electroosmóticas ni las producidas por el flujo hidrodinámico de la solución tampón, por haberlas considerado constantes a lo largo de nuestra experiencia.

Así mismo debemos tener en cuenta que la movilidad de una proteína depende:

- a) De la propia proteína (carga eléctrica y dimensiones moleculares).
- b) De la solución tampón (pH, concentración y naturaleza de los iones disueltos).
- c) De las interacciones de la solución tampón y de la proteína.
- d) De la naturaleza del medio electroforético y de las condiciones de corrido.

Siguiendo las orientaciones, habíamos comprobado que la solución tampón más conveniente para nuestro estudio era la de Smithies (32), con lo que el punto c, citado anteriormente, estaba establecido de antemano, así como el a. Puesto que no deseamos modificar la molécula de hemoglobina (convirtiéndola en algún derivado metahemoglobínico oxihemoglobínico, carboxi-hemoglobínico, etc.), establecimos nuestras hipótesis de trabajo teniendo en cuenta los puntos b y d. En el primero, se estudió la movilidad con respecto al pH del medio y una vez establecido este pH óptimo lo sometimos a variación de concentración de las soluciones tampón y al efecto de otros iones disueltos. Una vez seleccionadas las condiciones de la solución tampón, se investigó el efecto de tamiz que produce el gel de almidón a diferentes concentraciones, con el fin de conseguir el cumplimiento de las condiciones a, b, c, y d señaladas anteriormente. Los resultados de estas experiencias vienen dados en el cuadro II y en las figuras 1, 2 y 3. Como podrá observarse en dichos cuadros, el pH que se consideró óptimo fue el de 8,2, pues la separación entre las Hb-A y B es la mayor. Aunque a pH 8,1 se obtiene la misma separación, no se eligió, ya que las fracciones aparecían con menos nitidez en el corrido.

La concentración de almidón elegida fue la de 29 g en 250 ml de solución, ya que la separación de las Hb-A y B era prácticamente constante a lo largo de toda la experiencia; por lo tanto elegimos esta concentración como la óptima, pues a concentraciones más bajas el gel era demasiado frágil y superiores concentraciones suponían un gasto superfluo de almidón.

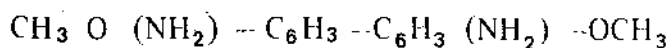
Sabemos que la hemoglobina tiene actividad peroxidásica, es decir, que la hemoglobina, en presencia de peróxido de hidrógeno, actúa de aceptador de hidrógeno. El dador de hidrógeno puede ser cualquier compuesto orgánico que al ser oxidado cambie de color; así tenemos, entre otros, la O-dianisidina.

Estas soluciones específicas para las hemoglobinas tienen la particularidad de que, al actuar solamente sobre la actividad peroxidásica de la proteína no revelan más que aquellas moléculas que presentan dicha propiedad, con lo que el resto del gel en el corrido electroforético quedaría completamente limpio, a excepción de las distintas bandas en que se hallan separadas las proteínas.

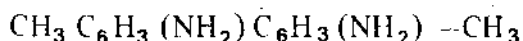
Las soluciones de teñido usado en las pruebas realizadas han sido:

Bencidina. $\text{H}_2\text{N C}_6\text{H}_4\text{--C}_6\text{H}_4\text{--NH}_2$

O-dianisina. Dimetoxibencina



O-toluidina. 3-3 Dimetil-bencidina



Los resultados obtenidos se dan en el cuadro V, del que se deduce que con el colorante bencidina fueron positivos los resultados en muestras que tenían una concentración de hemoglobina de 26×10^{-6} g/ml, obteniéndose el mismo resultado para el colorante O-toluidina. La dianisidina, sin embargo, sobrepasó este valor, dando positiva a concentraciones de 13×10^{-6} g/ml, por lo cual la consideramos como el colorante idóneo para el teñido de las hemoglobinas.

Aunque Bard y col. (2) y otros investigadores (Breathnach, (6); Drury y col. (9); Karvonen, (22); Kleilhaver y col. (25) afirman que en el momento del nacimiento de los corderos la hemoglobina fetal se manifiesta junto con el tipo de hemoglobina adulta, hemos encontrado a lo largo de nuestra experiencia que no en todos los animales se verificaba este hecho. Así, para los corderos de la raza rasa aragonesa hemos encontrado que en algunos de ellos al nacer, únicamente se evidenciaba la hemoglobina fetal, siendo estos valores de 6,25 p. 100 para los animales de Hb-BB y de 9,09 p. 100 para los del tipo AB. En la raza merina Fleischschaf estos valores fueron del 25 p. 100 para los animales con Hb-AB, y no se dió ningún caso en animales con hemoglobina del tipo Hb-BB. Este hecho ha llegado, en casos extremos, hasta los catorce días. El haber podido apreciar este fenómeno probablemente se deba a que el número de animales estudiados a lo largo del trabajo ha sido muy superior al utilizado por otros investigadores en experiencias similares. Esta circunstancia, de aparecer la hemoglobina fetal sin su respectiva hemoglobina adulta, nos puede inducir a pensar que sigue sintetizándose después del nacimiento, pero mediante el análisis de los datos obtenidos por densitometría y la cantidad de hemoglobina nos llevó a considerar que la síntesis de la hemoglobina fetal termina al nacimiento o antes de que éste se produzca, debido a que las cantidades de ésta van disminuyendo a lo largo de las extracciones sucesivas, de acuerdo con Breathnach (6), quien nos dice que en caso de que siguiese sintetizándose la hemoglobina fetal, lo sería en proporciones pequeñísimas; así mismo Drury (9) afirma que la síntesis de la hemoglobina fetal en condiciones normales termina antes del nacimiento.

En el resto de los animales las hemoglobinas adultas se evidenciaron en la primera toma de muestras.

La concentración de hemoglobina adulta es alrededor de un 10 p. 100 de la hemoglobina fetal, como se puede apreciar en las figuras 4 y 5 que representan las curvas de evolución de la hemoglobina fetal desde el nacimiento hasta su desaparición.

ción, para las dos razas estudiadas. Estas curvas se confeccionaron con los datos denstométricos, mediante las cuales se obtuvieron valores medios para los animales de la misma edad.

El escaso número de animales que en la experiencia se presentaban con la misma fecha de nacimiento y tipo de hemoglobina, para una misma raza, no ha alcanzado, por su gran dispersión, una representación gráfica en condiciones correctas, según los dictados biométricos. Para obviar este inconveniente, se han agrupado los animales por períodos de tres días, con el fin de obtener clases con datos más representativos de la gráfica, en la que también se ha incluido el tiempo transecurrido entre el nacimiento del animal y la hora en que se ha efectuado la toma de muestra todos ellos tipificados en la marca y clase. Con este criterio se elaboró la figura 6 en la que queda reflejada la evolución de la hemoglobina fetal para cada una de las razas, así como para el tipo de hemoglobina adulta.

En ningún caso las hemoglobinas adultas se evidenciaron en los animales recién nacidos sin la presencia de la correspondiente hemoglobina fetal.

Para el estudio de la edad media en que desaparece la hemoglobina fetal, los resultados se estudiaron a nivel de dos cotas cualitativas distintas: mediante la primera se estima la edad media, en días, de los corderos que aún presentan hemoglobina fetal (con Hb-F); y con la segunda, la edad, en días, a la que dicha hemoglobina ha desaparecido y solamente hay adulta. Mediante estas dos cotas obtenemos un intervalo de tiempo que nos define el período de terminación de la hemoglobina fetal.

Los datos con hemoglobina F y sin Hb-F fueron tomados con un intervalo de 7 días.

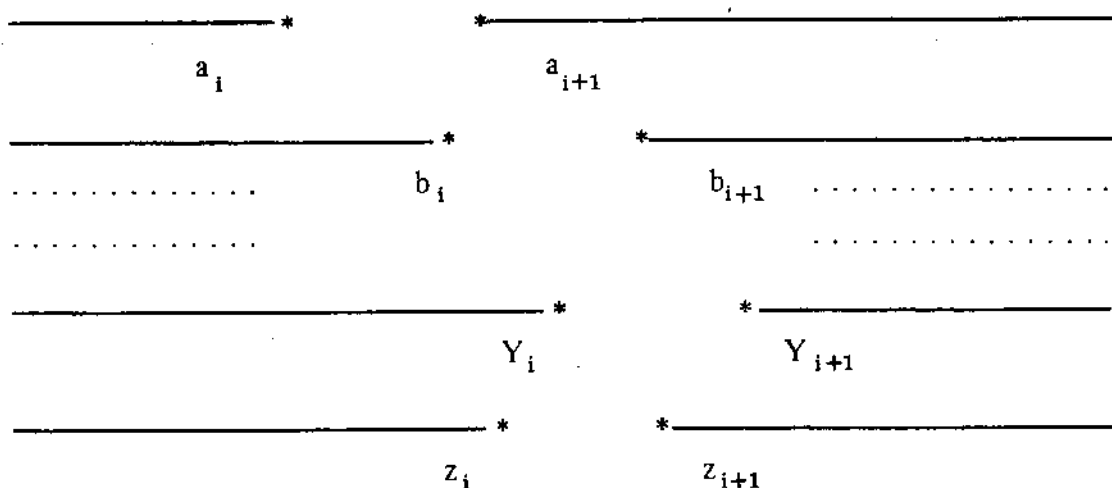
El criterio de valoración antedicho queda reflejado en el esquema 1 (pág. 20).

A partir de los datos de las tablas brutas y siguiendo el procedimiento anterior se ha llegado a los resultados.

Aunque la edad de permanencia de la hemoglobina fetal, tanto Breatnach (6) como Hammerberg (12) la cifran en 60 días, los resultados obtenidos, según hemos comentado anteriormente, reducen este período de tiempo a 40 días; cifra media coincidente con otros investigadores (Drury y col. (9 y 10); Huisman y col. (17); Riegel y col. (30) y con la nuestra, aunque lógicamente, al haber trabajado con bastantes animales, hemos encontrado individuos que han sobrepasado esta edad.

Una vez conocida la edad en que desaparecía la hemoglobina fetal en corderos, estudiamos la influencia que podía tener la posesión de la hemoglobina adulta, en un mismo animal, sobre la velocidad de desaparición de la fetal. Así hemos obtenido, en animales Fleischschaf de fenotipo hemoglobínico A (Hb-AA) el mayor tiempo de permanencia (hasta 36,5 días). En corderos de Hb-AB es en los que menos

tiempo subsiste (hasta 30 días), mientras que para los Hb-BB hemos obtenido una media de 31,5 días. Para los animales pertenecientes a la raza rasa aragonesa hemos obtenido la edad, para los de Hb-AA (hasta 34 días), mientras que para los de Hb-AB y Hb-BB se han obtenido, respectivamente, 27 y 32,6 días.



Cada línea representa la evolución de las hemoglobinas en un animal determinado. La primera parte,, hasta llegar al punto identificado con el subíndice i , nos reseña el tiempo durante el cual, mediante sucesivos análisis, hemos detectado la presencia de hemoglobina fetal. El espacio en blanco indica el tiempo transcurrido entre dos extracciones sucesivas. La línea que comienza a partir de los puntos $-i+1-$ nos señala la fase en que la Hb-F ha dejado de detectarse en nuestros análisis.

Las situaciones afectadas con el subíndice $-i-$ representan la edad del animal, determinada por la última extracción en la cual la muestra obtenida dio positiva, en la electroforesis, la presencia de hemoglobina fetal, y determina la primera cota.

Los subíndices $-i+1-$ representan igualmente la edad del animal en la primera extracción en la que no se evidenció la presencia de hemoglobina fetal, y determinan la segunda cota.

El intervalo de tiempo existente entre los puntos pares e impares, en la primera experiencia, fue de 10 días, mientras que en la etapa final (segunda experiencia) este período se redujo a 7 días.

Con el fin de apreciar gráficamente las diferencias de evolución de la hemoglobina fetal entre razas, se confeccionaron los histogramas de las figuras 7 y 8. Con idéntica finalidad realizamos las 9 y 10, en las que se puede ver la comparación, para los distintos tipos de hemoglobina, de la evolución de la hemoglobina fetal, para cada una de las razas.

CUADRO II. Datos obtenidos en las lecturas fotométricas para elaboración de la curva patrón.

ml de patrón de cianmetahemoglobina	ml de reactivo	Hemoglobina p. 100	Transmitancias	Absorbancias D. O.
0,0	6,0	0,0	100	0
1,5	4,5	5	71,5	0,146
3	3	10	52	0,284
4,5	1,5	15	38	0,420
6	0	20	26,5	0,577

CUADRO III. Distancias recorridas por las distintas hemoglobinas en las condiciones experimentales.

Tipo de Hb. Distancia en cm recorrida en el gel	A	F	B	C
1.º	11,8	10,4	8,5	5
2.º	12,1	10,7	8,8	5,8
3.º	11,6	9,9	8	5,2
4.º	12	10,5	8,9	5,8

CUADRO IV. Distribución, por rango, de los resultados del gradiente de la dilución, para diversos colorantes específicos de hemoglobinas.

Dilución	g/ml.	C O L O R A N T E		
		Bencidina	Toluidina	Dianisidina
1/1	133×10^{-4}	Positiva	Positiva	Positiva
1/2	665×10^{-5}	Positiva	Positiva	Positiva
1/4	332×10^{-5}	Positiva	Positiva	Positiva
1/8	166×10^{-5}	Positiva	Positiva	Positiva
1/16	83×10^{-5}	Positiva	Positiva	Positiva
1/32	415×10^{-6}	Positiva	Positiva	Positiva
1/64	207×10^{-6}	Positiva	Positiva	Positiva
1/128	103×10^{-6}	Positiva	Positiva	Positiva
1/256	52×10^{-6}	Positiva	Positiva	Positiva
1/502	26×10^{-6}	Positiva	Positiva	Positiva
1/1004	13×10^{-6}	Negativa	Negativa	Positiva
1/2008	6×10^{-6}	Negativa	Negativa	Negativa

Para estudiar la influencia de la hemoglobina materna sobre la velocidad de desaparición de la hemoglobina fetal, y dado el escaso número de descendientes que poseíamos de los fenotipos hemoglobínicos Hb-AA y Hb-BB, comparado el tiempo de desaparición de la Hb-B, en estos corderos, para madres con Hb-AB y Hb-BB y aunque no dió significativo para el 95 p. 100, sí fue muy próximo a él, por lo que podemos presuponer que con una muestra mayor cabría afirmar que el fenotipo de la madre influye sobre el tiempo de persistencia de la hemoglobina fetal en la descendencia.

Agradecimientos.

Deseamos hacer patente nuestro más sincero agradecimiento al Profesor Dr. Don José M. Viguera Lobo, Catedrático de Química Orgánica y Bioquímica, ponente de esta tesis. Al Profesor Dr. D. Antonio Rodero Franganillo, Profesor Agregado de Genética de la Facultad de Veterinaria de Córdoba y Director de la presente tesis, por su valiosa ayuda y orientación. Al Dr. D. Rafael Garzón Garrido-Espiga, por su colaboración y ayuda. Al Dr. D. José María Lasierra Hasta, por su cooperación con la toma de muestras. Al Dr. D. Manuel Lamuela Aguado, por su gran ayuda en los análisis efectuados. A D. José María Rodero Franganillo, por su valiosa colaboración en la resolución de problemas estadísticos y a la Srta. Rosa María Cristóbal Enguita, por su trabajo mecanográfico.

Además, a todo el personal auxiliar del Departamento de Genética y Mejora de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza.

Bibliografía.

1. Adair, G. S. 1939. --*Apud* Electrophoretic analysis and the constitution of native fluids. (Ed. Tiselius, A.) Haverly lect. 35: 37-70.
2. Bard, H., F. C. Battaglia, E. L. Makowski y G. Meschia, 1972. --The synthesis of fetal and adult haemoglobin in sheep during the perinatal period. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 139: 1148-1150.
3. Barron, D. H. 1951. --Some aspect of the transfer of oxygen across the syndesmochoorial placenta of the sheep. Yale J. Biol. Med. 24: 169-190.
4. Bartels, H. y K. Riegel, 1959. --Physiologische Veränderungen von O₂-Dissoziations - Kurven -- Lage beim Menschen, Schaf und der Zieg. Pflügers. Arch. ges. Physiol., 270: 62.
5. Braend, M., G. Efremov y O. Hellg, 1964. --Abnormal haemoglobin in sheep. Nature, 204: 700.

6. Breathnach, C. S. 1964.--Foetae and neonatae haemoglobins in sheep and goats. *Quart. S. exp. Physiol.* 49: 227-289.
7. Cabannes, R. y C. Serain, 1955.--Etude electrophoretique des hemoglobines des mammifères domestiques de l'Algerie. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 149: 1.193.
8. Dawson, T. J. y J. V. Evans, 1967.--Effect of anemia on oxygen transport in sheep with different haemoglobin types. *Aust. J. exp. Biol. Med. Sci.* 45: 437-444.
9. Drury, A. N. y E. M. Tucker, 1962. The haemoglobin changes in the newborn lamb. *J. Physiol (Lond.)* 162: 26-17.
10. -- 1963.--Red cell volume, potassium and haemoglobin changes in lambs. *Res. Vet. Sci.* 4: 568-579.
11. Evans, J. V. 1961.--Relationship between red blood cell potassium concentrations, medical corpuscular fragility and haemoglobin type in Merino and South Down sheep. *Nature (Lond.)* 192: 567-682.
12. Hammerberg, B., I. Brett y H. Kitchen, 1964.--Ontogeny of haemoglobins in sheep. *Ann. New York Acad. Sci.* 241: 672-682.
13. Harris, H. y F. L. Warren, 1957.--Haemoglobin types in British breeds of sheep. *Biochem. J.* 65: 42.
14. Hartmann, L. 1971.--Techniques modernes de laboratoire et explorations fonctionnelles. t. I. L'Expansion editeur.
15. Hellegers, A. E., G. Meschia, H. Prystowsky, A. S. Wolhoff y D. H. Barron, 1958.--A comparison of the oxygen dissociation curves of the bloods of maternal and fetal goats at various pHs. *Quart. J. exp. Physiol.*, 44: 215-221.
16. Helpert, P., R. G. Fleischmann, D. Kempe, H. Bartels, 1963.--The Bohr effect related to blood and erythrocyte pH. *Amer. J. Physiol.*, 205: 337-340.
17. Huisman, T. H. J., H. J. Van Der Helm, H. K. A. Van Der Visset y G. Van Vliet, 1959.--Investigations on different haemoglobin types in some species of animals. *Abnormal haemoglobins: A symposium.* J. H. P. Jonxis and J. F. Dela fresnoye, Eds. Blackell Scientific. Pub. Oxford. England.
18. Huisman, T. H. J. y A. M. Dozy, 1965.--Studies on the heterogeneity of haemoglobin. IX. The use of trisaminomethane-CHI buffers in the anion exchange chromatography of haemoglobins. *J. Chromatography*, 19: 160-169.

19. Huisman, T. H. J., J. P. Lewis, M. H. Blunt, H. R. Adams, A. Miller, A. M. Dozy y E. M. Boyd, 1969.--Haemoglobin in newborn sheep and goats: A possible explanation for its function and biosynthesis. *Pediat. Res.*, 3: 189-198.
20. Jonxis, S. H. P. 1949.--Haemoglobin. Eds. Roughton, G. W.; Kendrew, J. C. London: Butterworths.
21. Karvonen, M. J. 1949.--A solubility study of foetal and adult haemoglobin. *Apud* Haemoglobin. Eds. Roughton, G. W. and Kendrew, J. C., pp. 279-287.
22. Karvonen, M. J. 1949.--Oxygen consumptions of sheep maternal and foetal blood. *Acta physiol.*, 17: 267-275.
23. Kazazian, H. H. 1974.--Regulation of fetal haemoglobin production. *Simars in Haematology*. 11: 4.
24. Kendrew, J. C. y M. F. Perutz, 1948.--A comparative X-Ray of an adult sheep haemoglobin. *Proc. Roy. Soc. A.*, 194: 375-398.
25. Kleihauer, E. y G. Stoffler, 1968.--Embryonic haemoglobins of different animal species (quantitative and qualitative data about production and properties of haemoglobins during early development stages of pig, cattle and sheep. *Gen. Genetics* 101: 59-69.
26. Meshia, G., A. Hellegers, J. N. Blechner, A. S. Wolkoff, D. N. Barron, 1961.--A comparison of the oxygen dissociation curves of the bloods of maternal, fetal and newborn sheep at variations pH's. *Quart. J. exp. Physiol.*, 46: 95-100.
27. Monge, E., M. Vallejo, I. Zarazaga y J. M. Lasierra, 1973.--Identificación y evolución de la hemoglobina fetal (Hb F) en corderos. Primeros resultados. *Anal. Fac. Vet. Zaragoza*, 8.
28. Perk, K., Y. F. Frei y A. Herz, 1964.--The osmotic resistance and haemoglobin pattern of erythrocytes obtained from growing lambs. *Amer. J. Vet. Res.*, 25: 68-74.
29. Rapoport, S. y G. M. Guest, 1941.--Distribution of acid-soluble phosphorus in the blood cells of various vertebrates. *J. Biol. Chem.*, 138: 269-282.
30. Riegel, K., D. Hilpert y H. Bartels, 1961.--An investigation to compare erythrocyte morphology, the foetal haemoglobins and oxygen affinity of blood of infants, kids and lambs. *Acta haemat. (Basel)* 25: 164-183.
31. Smith, I. 1968.--Chromatographic and electrophoretic techniques. t. 2. Zone electrophoresis. Edic. segunda, William heinimann-Medical Books Ltd.

32. Smithies, O. 1955.--Zona electrophoresis in starch gels: Group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.* 61: 629.
33. Van Vliet, G. 1962.--Differentiatie in hemoglobinen bij het Nerlandse schaap. *Tijdschr. Dierneneesk.* 87: 597-606.