

## Estimación Cuantitativa de Haptoglobinas Séricas en Adultos Normales de Ambos Sexos

DR. FERNANDO ATMETLLA\*

DR. GERMAN F. SÁENZ\*

SR. JAVIER JIMÉNEZ\*

### INTRODUCCION

Las haptoglobinas son globulinas con movilidad electroforética tipo alfa 2, de naturaleza glicoproteica, genéticamente determinadas, que se caracterizan por su habilidad para combinarse rápidamente, estequiométricamente, y en forma irreversible con la hemoglobina extracorpúscular, tanto in vitro como in vivo (4, 7, 13, 14, 17, 19, 21, 22). La combinación de la haptoglobina con la Hb da como resultado un complejo estable (Hp-Hb) que muestra una intensa actividad peroxidasa (7, 13, 19, 22). Actualmente sabemos que la Hb y otros compuestos Heme tienen per se actividad peroxidasa, pero tal atributo de la Hb, por ejemplo, aumenta cuando se combina con la haptoglobina, aunque no se sabe a qué se debe el que tal combinación aumente la actividad de los radicales Heme (13, 25). La porción proteica de las Haptoglobinas consiste de dos clases de cadenas polipeptídicas designadas Hp-alfa y Hp-beta. Las variaciones genéticas de las Haptoglobinas están correlacionadas con las diferentes clases de cadenas alfa, por lo que las cadenas beta son comunes a los 3 tipos fundamentales descritos por Smithies y Walker (34), aunque este hecho ha sido puesto en duda (31). Gracias a investigaciones realizadas por electroforesis se demostró que la Hb se combina con la Haptoglobina y que el complejo que así se forma emigra entre las globulinas  $\alpha_2$  y beta. Asimismo la Hemoglobina en exceso, es decir la que queda una vez saturada la fracción  $\alpha_2$ , se localiza en el área de las betaglobulinas (14, 22). El complejo Hp-Hb es bastante estable, en cambio la Hb libre en exceso, es decir, la que supera la capacidad de conjugación del suero, es rápidamente transformada en hematina la cual, en parte, se une a la albúmina para formar la metahemalbúmina (21, 22).

Estas glicoproteínas, que poseen una elevada afinidad para la globina, sea que esté libre o combinada a radicales Heme, no son capaces de unirse a ferro o ferrihemes (22) ni a mioglobina (14). La afinidad por parte de las haptoglobinas hacia oxihemoglobina, metahemoglobina, cianometahemoglobina y carboxihemoglobina, es la misma (21).

Las hemoglobinas humanas  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $F_1$ , Lepore, C, I y S se unen en forma semejante con la haptoglobina sérica humana, mientras que las hemoglobi-

\* Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

nas H y Bart no lo hacen posiblemente por que estas 2 variantes no continen cadenas globínicas tipo alfa (22).

El complejo Hp-Hb resulta de una combinación de tipo 1-1, aunque también parece ser que se forman complejos intermediarios, lo cual parece sugerir la posibilidad de que la haptoglobina sea en realidad un polímero constituido por varias subunidades (13, 14, 22).

Las haptoglobinas se han estudiado en cuanto a su distribución, utilizando diferentes técnicas como electroforesis sobre gel de almidón, gel de agar, papel, inmunoelectroforesis, análisis por ultracentrifugación (13), espectrofotometría a base de etilhidroperóxido (35), desnaturalización ácida (28), iodometría (9), difusión en gel (7, 15), y columnas de sephadex (11).

Según la clasificación establecida por Smithies y Walker (34) hay tres posibles grupos de haptoglobinas (genotipos) determinados por dos genes autosómicos con dominancia incompleta: Hp 1-1 (homocigotos), Hp 2-1 (heterocigotas) y Hp 2-2 (homocigotos), siendo el raro tipo Hp 0-0, una expresión de ausencia total de Haptoglobinas (7, 4, 14). En los sueros Hp 1-1 se ve únicamente una fracción haptoglobínica; en los Hp 2-2 se observa una serie de 12 componentes haptoglobínicos y en los sueros Hp 2-1 se ven 7 fracciones distintas de las correspondientes a cada uno de los homocigotas (5). Las frecuencias relativas aproximadas de los 3 grupos haptoglobínicos en la población de raza caucásica, según Fleischer y Lundevall (8) son de: Hp 1-1 15%, Hp 2-1 50%, y Hp 2-2 35%. Los estudios que han permitido el mejor conocimiento de las haptoglobinas séricas se han realizado fundamentalmente por electroforesis sobre gel de almidón (24, 34) y recientemente se ha podido demostrar (4, 6, 14, 31) que el control genético de los tipos haptoglobínicos es más complejo que el presentado en el esquema original de Smithies y Walker (34), por lo que se ha llegado a la conclusión de que los 3 tipos comunes de haptoglobinas no son la expresión de las combinaciones de 2 alelos sino que responden a la presencia de 3 de ellos, con lo cual los 6 fenotipos que así resultarían, son distinguibles únicamente después de la purificación y disociación de sus polipeptidos integrantes (6), asumiéndose que las múltiples bandas electroforéticas del tipo Hp 2-2 indican los varios grados de polimerización de las cadenas alfa y beta constituyentes de la molécula, por ejemplo  $(\alpha_2 \beta)_4$ ,  $(\alpha_2 \beta)_6$ ,  $(\alpha_2 \beta)_8$ , etc., en contraste con el tipo Hp 1-1, que es homogéneo y a base de  $(\alpha_1 \beta)_2$  (31).

En Latinoamérica se han hecho varias investigaciones acerca de la frecuencia del gene Hp<sup>1</sup>, (1, 2, 3, 18) y así, Arends y Gallango (3) reportan que los hallazgos fenotípicos en la población híbrida residente en Caracas, son propios de poblaciones latinoamericanas que se han formado por la mezcla de varios grupos raciales.

Las técnicas para la determinación rutinaria de la concentración de haptoglobinas son de dos tipos: Unas se basan en la determinación de la actividad peroxidasa del complejo Hp-Hb, tal y como lo hemos aplicado en el siguiente trabajo, en tanto que otras utilizan la electroforesis sobre distintos medios de sostén, que en nuestro caso lo fue el acetato de celulosa.

Ninguno de los métodos puede ser considerado enteramente satisfactorio, siendo el electroforético más directo y simple, pero en vista de que no se conoce en la actualidad con exactitud las proporciones en que se combinan molecularmente los polímeros de haptoglobina con la hemoglobina, lo que se estaría midiendo es la "capacidad de conjugación o enlace" de dichas proteínas

con la Hb más que aquellas per se (21). Los métodos basados en la actividad peroxidasa están sujetos a variaciones de la temperatura y de tiempo; asimismo es posible que se alteren las haptoglobinas in vitro, por lo que el complejo puede llegar a tener poca actividad peroxidasa aunque retenga sus propiedades electroforéticas (22). A despecho de estos inconvenientes, ambos métodos ofrecen mediciones que son de valor desde el punto de vista clínico.

Aunque hay algunas variaciones en las cifras publicadas como normales por los distintos autores, pueden tomarse como cifras límites promedio las comprendidas entre 40 y 170 (expresadas como miligramos de captación de Hb/100 ml de suero o plasma). Las variaciones normales para los 3 fenotipos principales de haptoglobinas son aparentemente distintas, obteniéndose los valores más altos en los sujetos Hp 1-1 (26). No hay diferencias significativas entre varones y mujeres y por regla general no se encuentran haptoglobinas detectables en los recién nacidos (4).

En vista de que la haptoglobina se une específicamente a la Hb cuando hay hemólisis intravascular, existe una relación directa entre la capacidad de conjugación del suero para con la Hb y la aparición de Hb en la orina (27). Se sabe que la hemoglobinuria ocurre solamente cuando la concentración de Hb plasmática excede los 140 mg%, lo que quiere decir que el hallazgo de Hb en orina sucede luego de que se ha saturado la capacidad de combinación del plasma con la Hb (12, 16, 23). Aunque la permeabilidad de los glomérulos a la Hb libre es relativamente baja, es considerablemente mayor que para la albúmina y otras proteínas de peso molecular similar. Esto puede ser explicado en parte por el hecho de que la hemoglobina tiende a disociarse en dímeros alfa-beta al pH fisiológico del plasma (17). Recientes estudios han demostrado que la masa de Hb filtrada por los glomérulos en la mayoría de los desórdenes clínicos que cursan con hemoglobinuria, es reabsorbida hacia el plasma para su reutilización, al igual que la globina y la protoporfirina, por lo que las células de los tubos proximales recuerdan al sistema retículo-histiocitario (SRH) en cuanto a su habilidad para conservar el hierro de la hemoglobina. Como la concentración plasmática de haptoglobina es de  $0.1 \pm 0.04$  gr% (16), aproximadamente 100 mg de hemoglobina son unidos por 100 ml de plasma. El complejo Hp-Hb que tiene una vida media de 60 a 90 minutos (22), es de gran peso molecular por lo que no es filtrado por el riñón siendo aclarado rápidamente del plasma por el SRH, especialmente del hígado, en donde la enzima heme-alfa-metil oxigenasa degrada la hemoglobina de su combinación con la haptoglobina (11), catabolizándose la hemoglobina de la manera usual (17, 23). Cuando la hemólisis intravascular continúa por largos periodos o la cantidad de Hb libre es suficientemente grande en un momento determinado, la capacidad de combinación de las haptoglobinas se ve excedida, apareciendo Hb libre en la orina y por ende en el plasma, siendo esta última más rápidamente depurada que el complejo Hp-Hb (9). Por otra parte se cree que la masa de haptoglobina sintetizada por día es constante, indiferentemente de su grado de remoción, indicando ello que el hígado no incrementa su síntesis en respuesta a bajas concentraciones de la proteína y aún bajo presencia de Hb libre (9). De esta forma, luego de que una considerable cantidad de Hb se ha liberado a la circulación, la concentración de las haptoglobinas caerá rápidamente a un valor de 0 entre 8 a 12 horas (22), comprendiéndose así el valor médico que representa la medición cuantitativa de haptoglobinas séricas en estas circunstancias. Consecuentemente, cuando el grado relativo de destrucción eritrocítica es mayor que el de la producción o síntesis de haptoglobinas, los valores de haptoglobinas pueden disminuir a valores muy bajos o desaparecer del

todo, y así observamos como los niveles de estas proteínas heterogéneas están disminuidas en muchas enfermedades hemolíticas, incluyendo hemoglobinuria paroxística nocturna, esferocitosis hereditaria, drepanocitosis, talasemia mayor, anemia perniciosa sin tratamiento, y otras (22). Por otra parte, individuos con tara drepanocítica o de talasemia tienen niveles usualmente normales, señalándose lo mismo en pacientes con deficiencia de G-6-PD (4).

En ciertas ocasiones en que no hay haptoglobinas disponibles, una globulina beta denominada hemopexina, puede combinarse con Hb y hematina removiéndolas en parte del plasma (11, 14). Si no hay presentes en el plasma haptoglobinas ni hemopexinas, la Hb libre se desnaturaliza en parte en hematina la cual se une con la albúmina para formar un compuesto denominado metahemalbúmina.

De hecho las causas más comunes de bajos niveles de haptoglobinas séricas, en condiciones patológicas, se deben a un incremento de su catabolismo, que puede ser el resultado de un incremento de la hemólisis de los eritrocitos circulantes o de una destrucción aumentada de sus precursores nucleados en médula ósea, tal como es lo característico en la llamada eritropoyesis ineficaz, tan conspicua en la anemia perniciosa. En anemias hemolíticas la disminución de las haptoglobinas séricas se hace evidente cuando la vida media (T/2) de eritrocitos marcados con Cr<sup>51</sup> es inferior a los 23 días, demostrándose que cuando la T/2 es de 17 días o menos la haptoglobina está virtualmente ausente del suero (14).

La elevación de las globulinas Alfa<sub>2</sub> séricas, es a menudo debida a un incremento de la haptoglobina toda vez que ellas constituyen la mayor porción de esas globulinas (25%) (7). Sin embargo esto no es siempre cierto, y así, en la nefrosis, puede haber incremento de la fracción alfa<sub>2</sub> sin un incremento paralelo de las haptoglobinas. Asimismo, en esta condición usualmente no aparecen cantidades cuantificables de haptoglobinas en orina, aunque ocasionalmente pueden excretarse grandes cantidades del tipo Hp 2-1 (20). Las haptoglobinas proveen un método satisfactorio para seguir el estado de actividad de algunas enfermedades. En algunos hospitales son usadas como "reactantes de fase aguda" de la misma manera en que se utiliza el valor de la eritrosedimentación (4). Las haptoglobinas pueden o no estar aumentadas en cáncer y, en inflamación, infección o bajo terapia esteroide, frecuentemente hay elevación de las mismas, las cuales pueden enmascarar el efecto de una hemólisis incrementada (11, 32).

En este trabajo, indicamos los resultados que hemos obtenido en la cuantificación de haptoglobinas séricas en individuos adultos normales, con base en un método colorimétrico, ampliamente difundido, y una comparación, a título de referencia, de los hallazgos citados con un método electroforético en acetato de celulosa.

## MATERIAL Y METODOS

Se tomaron muestras de sangre de estudiantes universitarios de ambos sexos, con edades comprendidas entre los 17 y 25 años, de aparente buen estado de salud y con valores normales del eritrón circulante de acuerdo con las cifras normales reportadas para Costa Rica por Sáenz et al. (30). Se tomaron los cuidados necesarios para que las muestras no sufrieran ningún grado de hemólisis.

Para la determinación cuantitativa de las haptoglobinas séricas utilizamos dos tipos de métodos, el colorimétrico de Owen et al. (25), con el cual practicamos 282 determinaciones, y el electroforético en acetato de celulosa, para fines comparativos y de referencia, en 25 especímenes.

El método de Owen et al. es un procedimiento simple basado en la actividad peroxidasa del complejo haptoglobina-metahemoglobina. La haptoglobina presente en el suero se combina con la metahemoglobina que se añade, formando un complejo haptoglobina-metahemoglobina, cuya capacidad peroxidasa es medida mediante la oxidación del guayacol a tetraguayacol, mediante el peróxido de hidrógeno. En vista de que el método tiene sus particularidades y por haberle introducido pequeñas variantes, lo consignamos a continuación con todo detalle.

#### REACTIVOS:

##### *Reactivo de guayacol*

Se disuelven 3.72 gr del reactivo de guayacol en 700 ml de agua destilada a la cual se le ha agregado 100 ml de ácido acético 1 Molar. Se ajusta el pH a 4 con NaOH 1N, empleando para ello un medidor de pH de electrodo de cristal. Por último se completa el volumen a 1 litro con agua destilada.

##### *Peróxido de hidrógeno al 0.05M*

Se prepara inmediatamente antes de su uso, diluyendo 5.66 ml del reactivo peróxido de hidrógeno —grado 100 volúmenes— (30%) con agua destilada hasta un litro.

##### *Solución de Metahemoglobina*

Lavar eritrocitos humanos con solución salina fisiológica por lo menos 3 veces. A 8 volúmenes de estos eritrocitos, agregar 3 volúmenes de agua y un volumen de éter. La mezcla se agita fuertemente hasta que se observe hemólisis total, se centrifuga y se obtiene el hemolizado claro. Determinar la concentración de hemoglobina, diluir luego hasta que la concentración final de hemoglobina sea de 1g/100 ml. Tomar 25 ml. de esta solución y llevar a un frasco volumétrico de 500 ml, añadiendo 10 ml de la solución de ferricianuro de potasio al 0.1%; mezclar y dejar en reposo por 10 minutos para la total conversión de la hemoglobina en metahemoglobina. Finalmente, llevar a volumen con agua destilada.

Esta solución no se debe guardar a 0°C, tal y como lo recomienda el autor del método (3) ya que al descongelarla aparecen una serie de partículas cafés que no se vuelven a disolver.

##### *Cloruro de sodio 0.15M.*

#### PROCEDIMIENTO:

1— Diluir 1 volumen de suero libre de hemoglobina con 4 volúmenes de solución salina fisiológica. Pipetear alícuotas de 1 ml dentro de dos tubos marcados "prueba" y "blanco".

2— Al tubo "prueba" agregar 1 ml de la solución de metahemoglobina; dentro del "blanco", agregar 1 ml de agua destilada.

3— En un baño de agua con tapa y puesto a 25°C, colocar dos tubos marcados "prueba 2" y "blanco 2", cada uno con 5 mililitros del reactivo de guayacol. En otro tubo también a 25°C, agregar reactivo de peróxido de hidrógeno recientemente preparado.

4— Al tubo marcado "prueba 2", agregar 0.1 ml de la mezcla suero diluido-metahemoglobina; al "blanco 2", 0.1 ml de la mezcla agua-suero diluido.

5— Inmediatamente, agregar 1 ml del peróxido de hidrógeno precalentado y tome el tiempo de 8 minutos después de mezclar rápidamente los tubos. (La tapa del baño se debe cerrar durante estos 8 minutos con el fin de evitar el efecto de la luz sobre las soluciones).

6— Durante el periodo de incubación, conectar el espectrofotómetro y llevarlo a 0 de D.O. con agua destilada, utilizando una longitud de onda de 470 mμ.

7— Al terminar los 8 minutos de incubación, leer inmediatamente o dentro de los 4 minutos siguientes la D.O. de la "prueba 2" y del "blanco 2". Reste la absorbancia del "blanco" a la de la "prueba" y refiera esa D.O. a la curva de calibración. La concentración de haptoglobinas se expresa en términos de "metahemoglobina fijada" (mg%). Los tubos no deben ser expuestos a la luz brillante antes de leerse porque disminuye el color café naranja que se produce.

#### CONSTRUCCION DE LA CURVA DE CALIBRACION:

Se toman 11 tubos, en cada uno de los cuales se agregan las siguientes soluciones:

TUBO N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Metahemoglobina (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Suero (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
Salina (ml)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Volumen Total	2ml										

En un baño de maría a 25°C, colocar 12 tubos, cada uno de los cuales contiene 5 ml del reactivo de guayacol. A los diez minutos añadir a los tubos con el reactivo de guayacol, 0.1 ml de las mezclas antes señaladas y 0.1 ml de solución salina fisiológica a un tubo designado con el número 12.

Inmediatamente después, añadir a cada tubo 1 ml de peróxido de hidrógeno previamente calentado a 25°C. Los contenidos se mezclan inmediatamente. Después de 8 minutos, los tubos se sacan del baño de maría y los colores que han aparecido se miden espectrofotométricamente, cuyo cero se ha logrado

mediante el blanco con solución salina (Nº 12), a 470 mu. Las lecturas del espectrofotómetro en D.O. se colocan en las ordenadas en un papel de gráfico a escala aritmética y en las abscisas la cantidad actual de suero en los tubos de reacción (0.00 - 0.005 - 0.010 - 0.020 - 0.025 - 0.030 - 0.035 - 0.040 - 0.045 - 0.050). El punto de inflexión de la curva obtenida, a partir de la cual ésta se hace plana, indica que toda la metahemoglobina agregada se encuentra formando complejo con la haptoglobina, de tal forma que una agregación posterior de la haptoglobina libre (suero), no aumenta la actividad peroxidasa. Esta interpretación fue confirmada con los resultados obtenidos por Connell y Smithies (8) en electroforesis sobre gel de almidón, demostrándose que las soluciones correspondientes a la parte plana de la curva no contienen metahemoglobina libre.

#### NOTAS:

1) La metahemoglobina y la oxihemoglobina son muy similares en su actividad peroxidasa cuando se combinan con la haptoglobina; sin embargo se seleccionó la metahemoglobina por su mayor estabilidad (5).

2) El ferricianuro usado en la preparación de la metahemoglobina no interfiere con la estimación de las haptoglobinas por lo que necesita ser removido (5).

3) El guayacol es el donador de hidrógeno. Su pH se ajusta a 4 debido a que a ese pH la actividad peroxidasa de la hemoglobina libre es negligible mientras que la del complejo Hb-Hp está cercana al máximo (5).

4) El reactivo de guayacol aumenta lentamente su sensibilidad después de preparado por lo que la curva de calibración debe realizarse semanalmente (25).

5) La solución al 30% de peróxido de hidrógeno, debe guardarse en refrigeración y en una botella plástica (19).

6) Es de gran importancia un escrupuloso lavado de la cristalería con la cual se van a llevar a cabo las determinaciones, recomendándose dejarla un día en ácido clorhídrico 6N, o ácido nítrico al 25% (19) tal y como se hace con la cristalería para hierro sérico. De esta manera se eliminan sustancias contaminantes con actividad peroxidasa o inhibidores contaminantes de la reacción.

7) El suero si no se procesa de inmediato se guardará congelado hasta que un número suficiente se colecte. Un buen número de sueros se pueden correr a la vez, sin embargo como el tetraguayacol formado al final de la reacción es sensible a la luz, se debe ajustar el tiempo necesario para leer las determinaciones, de tal forma que las variaciones de tiempo no excedan los 4 minutos (7).

8) Nosotros comprobamos, al igual que Dragvik (7), que la solución de metahemoglobina es estable hasta 3 semanas a la temperatura del refrigerador.

Para la determinación electroforética de haptoglobinas, se siguió el procedimiento preconizado por Ruiz (29), ligeramente modificado por nosotros, siguiéndose para la cuantificación el criterio de Miale (21). El equipo utilizado fue Gelman Deluxe, incluido el integrador mecánico y tiras de acetato de celulosa sepraphore III, de 2.5 cm x 15 cm.

## REACTIVOS

Solución de hemoglobina AA (SS ó CC) ajustada a 3.8 grs. por 100 ml.  
Amortiguador de Tris-Barbital de pH 8.8. y fuerza iónica de 0.05.  
Solución de Orto-Tolidina (Disolver 150 mg en 6 ml de ácido acético al 33,3%. Cinco minutos antes de usarse, se agregan 2 ml de peróxido de hidrógeno al 3%).  
Acido tricloroacético al 5%  
Acido acético al 23.3%  
HCL Q.P.

## TECNICA

- 1.—Un volumen de la solución normal de hemoglobina AA diluida a 3.8 grs. por 100 ml. se mezcla con 9 volúmenes de suero problema. La concentración es de 380 mg. por 100 ml. Pueden usarse también concentraciones finales semejantes, siempre que los cálculos se efectúen en base a esas concentraciones. Incubar  $\frac{1}{2}$  hora a 37°C.

## ELECTROFORESIS

- 1.—Sumergir las tiras de acetato de celulosa en el amortiguador de TRIS-Barbital, de pH 8.8. Así pueden permanecer durante varios días.
- 2.—Llenar la cámara de electroforesis con 500 ml del amortiguador previamente refrigerado, nivelando el líquido en ambos compartimientos.
- 3.—Retirar la tira de acetato de celulosa húmeda, colocarla en una hoja de papel absorbente, secando su cara superior en el sitio donde se va a aplicar la muestra suero-hemoglobina.
- 4.—Con pipeta capilar llenar el aplicador, y colocar la muestra a 5.5 cm. del extremo de la tira. La aplicación debe hacerse verticalmente, sin ejercer presión.
- 5.—Poner las tiras en la cámara de electroforesis, cuidadosamente centradas y sujetadas por los fijadores imantados. Tapar la cámara que debe mantenerse siempre cerrada para evitar la evaporación y destaparse sólo cuando se vaya a colocar otra tira de acetato de celulosa.
- 6.—Conectar la cámara a la fuente de poder y hacer la electroforesis durante 45 minutos, usando 3 miliamperios por tira, de acuerdo con la intensidad de corriente local.
- 7.—Transcurrido ese lapso se fijan las proteínas de las tiras sumergiéndolas en ácido tricloroacético al 5% durante 5 minutos. Se tiñen después con O-Tolidina durante 10 minutos.
- 8.—Se elimina el exceso de colorante con un lavado de ácido acético al 23.3% exactamente por 3 minutos. En este momento se aprecian las bandas de color azul que corresponden: la más lenta a la hemoglobina libre; la intermedia al complejo hemoglobina-haptoglobina y una tercera banda que corresponde a la metahemalbúmina, cuando aparece.
- 9.—Luego de los 3 minutos, sumergir por tres pasajes diferentes de dos minutos cada uno las cintas en ácido acético al 5%, con agitación oscilante.

Finalmente se dejan en otra bandeja que contiene ácido acético al 5% hasta que se decida, en un lapso no mayor de 48 horas, aclararlas para su posterior cuantificación.

- 10.—Las cintas son aclaradas de la manera usual para proteínas séricas, leyéndose las proporciones de hemoglobina libre, del complejo haptoglobina-hemoglobina y de metahemalbúmina —cuando apareciese— en el integrador mecánico, calculándose la concentración absoluta de cada fracción de acuerdo con la concentración total de hemoglobina (380 mg).

### RESULTADOS

Los valores de haptoglobinas séricas obtenidos por el método colorimétrico de Owen et al. (25), en 282 adultos de ambos sexos, arrojó las siguientes cifras:

Promedio ( $\bar{X}$ )	=	94.1 mg%
D.S.	=	32.4 mg%
Valores margen	=	42.0 a 167.4 mg%

Los valores margen incluyen el 95% de los datos aproximadamente, al excluir un 2.5% de datos que son extremadamente bajos y un 2.5% extremadamente altos.

En 25 muestras analizadas por electroforesis en acetato de celulosa obtuvimos valores margen de 38 a 173 mg%, con un promedio de 102.3 mg%. La comparación de los dos métodos, con base en 19 muestras, ofreció una buena correlación, con diferencias no mayores de 15 mg% entre uno y otro, siempre positivas a favor del colorimétrico.

### DISCUSION

El valor clínico de cualquier estimación bioquímica depende básicamente de la frecuencia de aquellos niveles que están encima o fuera del margen normal para un particular grupo de desórdenes. Las variaciones patológicas en los niveles de haptoglobinas, se encuentran en varias enfermedades. Altos valores se asocian frecuentemente con infección, inflamación, enfermedades granulomatosas, neoplasia y terapia esteroide y, en general, dichos incrementos, se hallan frecuentemente relacionados con aumentos en el índice de eritrosedimentación, aunque tales proteínas por sí solas no son las únicas responsables de tal alteración (14). Bajos niveles de haptoglobinas después del primer año de vida son casi siempre de significado clínico, debiéndose recordar que hay situaciones genéticamente determinadas de hipo y de anhaptoglobinemias, que ocasionalmente se encuentran en algunas poblaciones (1, 2, 4, 10, 14, 36). En las enfermedades hepáticas los niveles de haptoglobinas son variables; en la cirrosis y en la hepatitis crónica los niveles son usualmente bajos y esto puede ser debido a varias causas incluyendo hemólisis, disminución de la síntesis de haptoglobinas y a un incremento en los niveles de estrógenos (4). Owen et al. (25) han encontrado valores bajos de haptoglobinas en enfermedades hepatocelulares y altos en obstrucción biliar y carcinomatosis secundarias. Sin duda alguna, las causas más comunes de niveles bajos —y usualmente permanentes— de haptoglobinas se deben a un incremento de su catabolismo, característica de los síndromes en que hay excesivo recambio hemoglobínico, tal y como sucede en los problemas hemolíticos, crónicos o agudos, especialmente heredo-constitucionales (4, 33).

Como nuestro interés primordial en el presente trabajo es el de dar a conocer el valor clínico que tiene la determinación de haptoglobinas séricas, además de la preconización de dos técnicas perfectamente adaptables a cualquier laboratorio de análisis clínico, nos parece conveniente citar algunos datos obtenidos por Shinton et al. (32) en un estudio realizado para poner en evidencia el valor diagnóstico de las haptoglobinas séricas. Dichas proteínas se estimaron en 25 pacientes con enfermedad hemolítica, 149 con otras formas de anemia y 37 con desórdenes no hematológicos, encontrándose valores subnormales en el 80% de pacientes con enfermedad hemolítica o anemia megaloblástica, con hemorragia en tejidos y ocasionalmente en asociación con otras enfermedades. Los autores concluyen afirmando que esta simple estimación bioquímica en conjugación con otros cuadros clínicos y de laboratorio es de valor diagnóstico, especialmente para la dilucidación de trastornos hemolíticos, aunque debe tenerse presente que niveles normales de haptoglobinas no excluyen la posibilidad de un mecanismo hemolítico, especialmente cuando éste ocurre en pacientes que presentan concomitantemente condiciones anormales que se sabe originan elevaciones importantes de haptoglobinas séricas (11, 32).

Nosotros hemos podido constatar, con base en los dos métodos aquí consignados, valores de 0 mg% de haptoglobinas en drepanocitosis, esferocitosis hereditaria, enfermedad por S-Thal y HPN, así como niveles incrementados de más de 200 mg% en artritis reumatoide, LED e infecciones. En varios sueros de cordón umbilical, no encontramos del todo haptoglobinas, tal y como era de esperar, situación que nos permitió conservar sueros patrones de referencia.

Los resultados que aquí se consignan de la investigación llevada a cabo para conocer los niveles normales de haptoglobinas séricas, en adultos de ambos sexos, son muy semejantes a lo que otros autores han reportado. Vemos así como con el método de Owen et al. (25), utilizado en el presente trabajo, Lynch et al. (19) reportan un valor medio de 100 mg/100 ml, siendo el nuestro de 94.1 mg%. Shinton et al. (32), señalan márgenes de 33 a 213 mg%, y Roy et al. (28) de 40 a 188 mg%, con una media de 96 mg%, mientras nuestros hallazgos indican valores extremos de 42.0 a 167.4 mg%. Por electroforesis en papel, Miale (22) reporta valores margen de 40 a 150 mg%, con un promedio de 90 mg%. El método referido por el autor, utiliza hemolizado de sangre AA, mientras otros autores recomiendan el uso de Hb CC con el fin de separar en mejor forma la Hb libre del complejo Hp-Hb. Nosotros utilizamos indistintamente hemolizados AA, SS y CC para las corridas electroforéticas, constatando que ciertamente los hemolizados SS y CC dan mejor separación, pero no son del todo indispensables, pues con Hb AA logramos buenos resultados.

A propósito, Miale (21) recomienda un búffer de acetato de pH 4.7 para una mejor delimitación de las bandas sin que sean necesarios otros hemolizados que no sean AA. Nosotros, sin ánimo de consignar valores normales de haptoglobinas por electroforesis en acetato de celulosa, pretendemos eso sí consignar la bondad del método y la buena correlación con el colorimétrico de Owen et al. (25). En 25 muestras analizadas se obtienen valores margen de 38 a 173 mg%, con una media de 102.3 mg%, resultados semejantes a los ya señalados por Miale (12). La comparación de 19 muestras, por ambos métodos, ofreció una buena concordancia de los resultados con diferencias que nunca fueron mayores de 15 mg%, siempre positivas a favor del método colorimétrico. Es claro que para ambos métodos, lo que se mide es la capacidad de enlace o fijación del suero para con la Hb (por las haptoglobinas), es decir, son mediciones indirectas. En todo caso, en la cuantificación de las cintas de acetato

de celulosa, por densitometría se asume que la Hb y la haptoglobina se combinan en proporción 1:1, a pesar de que esto no sea enteramente cierto por lo menos para los tipos Hp 2-2 y Hp 2-1 (21). No nos queda ninguna duda que el método electroforético es más rápido y práctico. Sin embargo, creemos que al preconizar el colorimétrico de Owen et al., contribuimos con aquellos laboratorios que no posean la facilidad del equipo electroforético y cuantificador.

Finalmente, esperamos que este trabajo nos sirva de experiencia para que en el futuro podamos hacer una investigación de los sistemas haptoglobínicos de nuestras distintas poblaciones raciales.

#### R E S U M E N

Se hace un análisis suscito de las propiedades Físico-Químicas y fisiológicas de las haptoglobinas séricas, así como de sus características genéticas y de su valor diagnóstico en diversos desórdenes.

Se obtienen valores normales de estas mucoproteínas séricas en población estudiantil de ambos sexos, con edades comprendidas entre los 17 y 25 años, con base en el método colorimétrico de Owen et al. (25), con las siguientes cifras:

$\bar{X} = 94.1 \text{ mg\%}$ , D.S. =  $32.4 \text{ mg\%}$  y valores margen =  $42.0 - 167.4 \text{ mg\%}$ .

En muestras analizadas por el método electroforético en acetato de celulosa se logra apreciar una buena concordancia con respecto al de la actividad de peroxidasa.

#### B I B L I O G R A F I A

- 1.—ARENDS, T. AND M. L. GALLANGO.  
1962. Haptoglobin and transferrin groups in Venezuela. Proc. 8th Congr. Int. Soc. Blood Transf., 379-382.
- 2.—ARENDS, T. Y M. L. GALLANGO.  
1962. Frecuencia de haptoglobinas en varias poblaciones suramericanas. Acta Cient. Venez., 13 (4): 116-119.
- 3.—ARENDS, T., AND M. L. GALLANGO.  
1965. Hemoglobin types and blood serum factors in British Guiana indians. British J. Hemat., 11:350-359.
- 4.—BLUMBERG, B. S.  
1964. Clinical Significance of serum haptoglobins, p. 318-324. En F. W. Sunderman, y F. W. Sunderman Jr., Hemoglobins, its precursors and metabolists. J. B. Lippincott Co., Philadelphia.
- 5.—CONNELL, G. E., AND O. SMITHIES.  
1959. Human haptoglobins: estimation and purification Biochem. J., 72:115-121.
- 6.—CONNELL, G. E., G. H. DIXON AND O. SMITHIES.  
1962. Subdivision of the three common haptoglobin types based on "Hidden" differences. Nature, 193:505-506.
- 7.—DRAGVIK, M. M.  
1970. Haptoglobin determination in the study of hemolytic anemia. Canad. J. Med. Tech., 32:21-30.
- 8.—FLEISCH, E. A., AND J. LUNDEVALL.  
European Soc. Haemat. Congr. 6 Copenhagen. Proc. Vol. 2:906 (citado en 18).

- 9.—FREEMAN, T.  
1964. Haptoglobin metabolism in relation to red cell destruction. D. Glycoproteins. p. 344-352. En H. Peeters, Ed., Protides of the biological fluids. Elsevier Publishing Company, Amsterdam.
- 10.—GRAS, J.  
1967. Proteínas plasmáticas. Fisiocoquímica, metabolismo, fisiopatología y clínica de las proteínas extracelulares. 3era. Ed. XXIII + 694 pp. Editorial Jims, Barcelona.
- 11.—GREY, M. J.  
1969. A modified procedure for the estimation of serum haptoglobins using sephadex G-100. N. Z. J. Med. Lab. Technol., 23 (1): 1-10.
- 12.—HARRIS, J. W., AND KELLERMAYER, R. W.  
1970. The red cell. Production, metabolism, destruction: Normal and abnormal. XXII + 795 pp. Published for the Commonwealth Fund by Harvard University. Press Cambridge, Massachusetts.
- 13.—HENRY, R. S.  
1969. Química Clínica, Bases y Principios, Tomo II. XIX + 1341 + XVIII pp. Editorial Jims, Barcelona.
- 14.—JAVID, J.  
1967. Human serum haptoglobins. A brief review, p. 35-52, en Peter A. Niescher: Seminars in Hematology, Vol. 4, N° 1, 1967. Grune and Stratton publishers, New York, U.S.A.
- 15.—KLUTHE, R. J. FAUL, AND H. HEIMPEL.  
1965. Cuantitative estimation of human serum haptoglobin by an immunological method. Nature, 205:93-94.
- 16.—LAURELL, C. B. AND NIJMAN, MARGARET.  
1957. Studies on the serum haptoglobin level in hemoglobinemia and its influence on renal excretion of hemoglobin. Blood, 12(6):493-506.
- 17.—LEAVELL, B. S. AND O. A. THORUP.  
1971. Fundamentals of clinical hematology. W. B. Saunders Co., 3th Ed., XIV + 659 pp. Philadelphia, U.S.A.
- 18.—LISKER, R., A. LORÍA, AND M. SOLEDAD CÓRDOVA.  
1965. Studies on several genetic hematological traits of the mexican population. VIII. Hemoglobins, glucose-6-phosphate deshydrogenase deficiency and other characteristics in a malarial region. A. J. Human Genet. 17:179-187.
- 19.—LYNCH, M. J., RAPHAEL, MELLOR, L. O. SPARE, P. D., AND INWOOD, M. J. H. ....  
1969. Medical Laboratory Technology and Clinical Pathology 2ª Ed. XI + 1359 pp., J. B. Saunders Co., Philadelphia, U.S.A.
- 20.—MARNAY, A.  
1961. Haptoglobinuria in nephrotic syndrome. Nature, 191:75-76.
- 21.—MIALE, J. B.  
1964. Typing and quantitation of serum haptoglobins, p. 325-331. En F. W. Sunderman and F. W. Sunderman Jr., Hemoglobin, its precursors and metabolites. J. B. Lippincott Co., Philadelphia.
- 22.—MIALE, J. B.  
1967. Laboratory Medicine Hematology, 3th Ed., X + 1257 pp. C. B. Mosby Co. Saint Louis, USA.
- 23.—MURRAY, R. K., G. E. CONNELL AND J. H. PERT.  
1961. The role of haptoglobin in the clearance and distribution of extracorporeal hemoglobin. Blood, 17:45-53.
- 24.—OWEN, J. A., H. J. SILBERMAN AND C. GOT.  
1958. Detection of hemoglobin, hemoglobin-haptoglobin complexis and other substances with peroxidase activity after zone electrophoresis. Nature, 182:1372.
- 25.—OWEN, J. A., F. C. BETTER, AND J. HOBAN.  
1960. A simple method for the determination of serum haptoglobins J. Clin. Path., 13:163-164.

- 26.—PLANAS, J. J. VIÑAS, S. DE CASTRO, J. M. ARRIBAS AND M. C. MARTIN-MATEO.  
1965. The values of haptoglobins and their relation to the genetic type in a group of donors. *Rev. Esp. Fisiol.*, 21(1):15-20.
- 27.—RAVEL, R.  
1969. *Clinical Laboratory Medicine. Application of laboratory data.* 415 pp. Year Book Medical Publishers, Inc. Chicago.
- 28.—ROY, R. B., R. W. SAW AND G. E. CONNELL.  
1969. A simple method for the quantitative determination of serum haptoglobin. *J. Lab. Clin. Med.*, 74:698-704.
- 29.—RUIZ, G.  
1970. *Manual del curso teórico-práctico sobre métodos electroforéticos básicos en hematología.* Auspiciado por la Agrupación Mexicana para el estudio de la Hematología, Hospital de Puebla, México.
- 30.—SÁENZ, G. F., G. ARROYO Y E. VALENCIANO.  
1971. Valores normales de hemoglobina y hematocrito en adultos. *Rev. Med. Hosp. Nal. Niños*, 6:53-70.
- 31.—SHIM, B. S., T. H. LEF, AND Y. S. KANG.  
1965. Immunological and Biochemical Investigation of human serum haptoglobin: Composition of haptoglobin-hemoglobin intermediate, hemoglobin-binding sites and presence of additional alleles for B-Chain. *Nature*, 207:1264-1267.
- 32.—SHINTON, N. K., R. W. RICHARDSON, AND J. D. F. WILLIAMS.  
1965. Diagnostic value of serum haptoglobin. *J. Clin. Path.*, 18:114-118.
- 33.—SMITH, C. H.  
1969. *Hematología Pediátrica*, 1era. Ed. Esp. XVIII + 741 pp. Salvat Ed., S. A., Barcelona.
- 34.—SMITHIES, O., AND NORMA F. WALKER.  
1956. Notation for serum-protein groups and the genes controlling their inheritance. *Nature*, 178:694-695.
- 35.—TARUKOSKI, P. H.  
1966. Quantitative spectrophotometric determination of haptoglobin. *Scand. J. Clin-Lab. Inv.*, 18(1):80-86.
- 36.—THOMPSON, J. S., Y M. W. THOMPSON.  
1968. *Genética médica XII* + 351 pp. Salvat Eds., S. A., Barcelona.