CUANTIFICACION DE HAPTOGLOBINAS SERICAS POR UN METODO MODIFICADO DE PEROXIDACION

Mario Chaves, German F. Sáenz*, Alberto* G, *Montero**
Javier Jiménez, Miriam Salgado**

Key Word Index: Owen's haptoglobin quantification method, modified, haptoglobin determination micromethod.

Resumen

Con el deseo de preconizar un método sencillo y de bajo costo para cuantificar haptoglobinas séricas, se tomó de referencia el de la peroxidación de Owen et al., *estableciéndose una serie de experimentos, que lo hacen más práctico para su uso rutinario en cualquier laboratorio. Dentro de las principales modificaciones introducidas se encuentran la mayor estabilidad de los reactivos, el uso de un estándar primario de CNMHb, la corrección de los valores encontrados cuando se procesan muestras con clara evidencia de hemólisis espuria, el carácter de micrométodo y una estandarización sencilla que permite el uso de la curva de calibración hasta por un mes luego de establecida. (Rev. Cost. Cienc. Méd. 1982; 3(2): 135 –148).*

Introducción

Las haptoglobinas (Hp) son glicoproteínas genéticamente determinadas, constituyentes del plasma normal, que reaccionan estequiométricamente con la hemoglobina (Hb). Forman un complejo soluble y estable (Hb-Hp), que es catabolizado rápida y principalmente por el hígado (11). A pesar de su marcada estabilidad, el complejo Hb-Hp no comprende uniones covalentes, y presenta una intensa actividad peroxidásica (17, 29), cuyo mecanismo no se ha establecido claramente, sugiriéndose que exista una verdadera activación de los grupos heme (16). Se puede distinguir por electroforesis en gel de almidón al menos tres distintos tipos hereditarios de Hp (31). El patrón de herencia sugiere un sistema de dos alelos con dos formas homocigóticas (Hp 1-1 y Hp 2-2) y una forma heterocigota (Hp 2-1) (30). Todos los tipos de Hp contienen dos clases de cadenas polipeptídicas, alfa y beta, las cuales se encuentra bajo un control genético separado. Al menos el locus del gene de cadenas alfa se encuentra en el brazo largo del cromosoma 16 (25), desconociéndose el de las cadenas beta. Sin embargo, estudios que muestran la segregación de ambos alelos indican que los dos loci no se encuentran íntimamente ligados (9). Las cadenas beta son idénticas en los fenotipos comunes, no así las alfa en donde los varios tipos encontrados son codificados por alelos a nivel de locus Hp alfa.

Al igual de lo que sucede con la molécula de Hb, se han descrito variantes de cadenas alfa y beta y de un genotipo Hp^o (Ahaptoglobinemia) (11). Dada la combinación estequiométrica entre Hp y Hb, la mayoría de los métodos que se han propuesto para la cuantificación de esa proteína se basan en la capacidad de combinación de la Hb, con un rango normal de 40-180 mg de Hb combinada por 100 ml de suero o plasma (12). En la

* Centro de Investigación de Hemoglobinas Anormales y Trastornos Afines (CIHATA), Cátedra de Hematología, Departamento de Análisis Clínicos, Universidad de Costa Rica, Hospital San Juan de Dios.

mayoría de estos métodos un exceso de Hb se añade al suero a fin de saturar la Hp, estimándose la cantidad formada del complejo H-Bb por su actividad peroxidásica. El complejo puede también ser separado de la Hb libre por electroforesis en vista de su mayor movilidad (15, 24) o por filtración en geles dado su mayor tamaño molecular (13). El estándar primario que se utiliza para estos métodos es una solución de Hb (usualmente como metaHb). La estimación inmunoquímica directa no se usa con frecuencia porque la composición molecular del estándar y del desconocido son a menudo diferentes dada la heterogeneidad de la Hp (23).

La técnica del electroinmunoensayo no es afectada por esa variable, dando, por lo tanto, valores apropiados (6). También se ha utilizado el radioinmunoensayo (10) para la medición de Hp. En todos estos casos el estándar primario es usualmente una muestra de Hp ensayada por otros métodos.

El método más utilizado para la cuantificación de Hp es el de la activación peroxidásica sucitada por la unión de Hp con Hb, siendo la técnica de Owen *et al.* (19) la más preconizada. En un trabajo previo realizado en nuestro país sobre el tema (1) tuvimos oportunidad de aplicar dicho procedimiento con buen éxito. Dos motivos fundamentales nos han movido a presentar este trabajo. En primer lugar, el lograr modificar el método original de los autores, haciéndolo más práctico, dentro del rango de micrométodo, mayor estabilidad de los reactivos, menor costo y una mejor estandarización global de toda la metodología. En segundo término, deseamos contribuir con el espíritu que anima el cuerpo microbiológico nacional ante la precaria situación económica por la que pasa nuestro país, al proporcionarles un método para cuantificar Hp que es simple, reproducible y de muy bajo costo.

Material y métodos

Para las diversas experiencias se usaron sueros y plasmas de individuos aparentemente normales. Para las mediciones fotométricas se utilizó un espectrofotómetro Perkin-Elmer, Hitachi modelo 200, con celdillas cuadradas de 1 x 1 cm. Todo el material utilizado para las determinaciones o experimentos se lavó previamente con HCI al 25 por ciento o $HN0_3$ al 25 por ciento por 24 horas.

Método

Para la medición de la Hp se siguió el fundamento del método de Owen *et al.* (19), en el cual la Hp del suero se combina con metaHb (en nuestra modificación con CNMetHb) para formar el complejo Hp-Hb, que se mide a través de su efecto catalizador (de tipo peroxidásico) sobre la oxidación del guayacol por el $H_2 O_2$, para dar tetraguayacol, expresándose la cantidad de Hp en términos de Hb combinada en mg/dl. Las condiciones de la prueba son tales queja actividad peroxidásica de la Hb libre es esencialmente nula (5), toda vez que el guayacol como sustrato reductor, a concentraciones mayores 2,5 mM, ha probado ser un poderoso inhibidor de la Hb libre. Por otra parte su pH de 4,0 permite evidenciar la máxima actividad peroxidásica del complejo Hp-Hb, siendo nula la de la Hb libre. La concentración de $H_2 O_2$ al 0,01 M, se escogió por ser la que da mejores grados de reacción (5, 29).

Reactivos

Guayacol 0,030 M

Disolver 3,72 gramos de guayacol G.A. - o medir 3,33 ml del mismo si es líquido (Sigma G5502, BDH o Merck 4212) - en 700 ml de agua desionizada, adicionando luego 100 ml de ácido acético 1 M. Ajustar el pH de la solución a 4,0 con NaOH 1 M. Aforar con H_2O desionizada a 1 litro. Guardar la solución en un recipiente ámbar en refrigeración. En estas condiciones el reactivo es estable por unas 2-3 semanas. De acuerdo con el volumen de trabajo del laboratorio, el reactivo se puede dispensar en viales de 100 ml, los cuales se congelan a --20°C. Al momento de su uso, el contenido de cada vial se deja descongelar a temperatura ambiente. La estabilidad del reactivo congelado es de varios meses (primera modificación).

Peróxido de hidrógeno 0,05 M

Este reactivo se prepara 30 minutos antes de ser utilizado, a partir de una solución de H_2O_2 al 30 por ciento (Merck 8597): Pipetear 0,575 ml de H_2O_2 y diluir en balón aforado a 100 ml con H_2O desionizada.

Solución salina 0,15 M

Pesar 8,7 g de NaCl y diluir con H_2O desionizada a 1 litro.

Solución de cianometahemoglobina (CNMHb) (50 ± 3 mg/dl).

A 25 ml de hemolizado de 1,0 g/dl, adicionar 250 ml de reactivo de Drabkin a fin de convertir la Hb a CNMHb. Dejar en reposo por 10 minutos y luego aforar a 500 ml con H_2O desionizada.

Una manera práctica de obtener el estándar de CNMHb de 50 mg/dl es diluyendo adecuadamente una solución homónima como la que se utiliza en hemoglobinometría, y cuyas concentraciones oscilan entre 60 y 80 mg/dl. Nosotros empleamos el reactivo ClANOCIHATA (Universidad de Costa Rica) para estos efectos (± 80 mg/dl), obteniéndose en forma rápida la concentración deseada de 50 mg/dl con el uso del coeficiente de extinción milimolar de 11,5 a 540 mm para un peso molecular de 16.700 (g/dl de CNMHb = $\frac{D.O.^{540} \times 16114,5 \times F}{11,0 \times 1 \times 10}$; de donde

$D.O.^{540}$: absorbancia de la solución de CNMHb; 16.114,5: masa molecular relativa de la Hb (derivada de $\frac{64458}{4}$); F: factor de dilución (1 :251); 11,0 coeficiente de absorción milimolar de la CNMHb a 540 nm; 1: paso de la luz en cm (cubeta cuadrada 1 x 1 cm). Si el estándar está correctamente preparado (50 mg/dl), su D.O. x 36,8 deberá dar un valor de 12,5 g/dl. La ventaja de usar este reactivo de CNMHb en vez del de metaHb estriba en su gran estabilidad a 4°C y su fácil preparación (segunda modificación).

Solución de methaemoglobina (MetHb) (50 mg/dl)

Como reactivo alternativo, se puede preparar MetHb de acuerdo con los autores del método (19) en vez de nuestra CNMHb. A 8 volúmenes de eritrocitos humanos lavados tres veces con solución salina, se les adiciona 3 volúmenes de H_2O desionizada y un volumen tetracloruro de carbono. Mezclar por agitación y luego centrifugar. Obtener con pipeta el hemolizado límpido. Determinar la concentración de Hb. Diluir el hemolizado a una concentración de 1 g/dl. A 25 ml de éste, añadir 10 ml de ferricianuro de potasio

(100 mg/dl), a fin de convertir la Hb en metaHb. Dejar 10 minutos en reposo y aforar a 500 ml con H_2O desionizada (manteniendo las proporciones se puede preparar menores volúmenes). Dispensar en viales volúmenes de 10-20 ml y guardar a 0°C. La solución de metaHb es estable por varias semanas. A -20°C la conservación es aún mayor (5).

Mezcla o bancos de sueros

Se prepara un banco a partir de sueros o plasma de sujetos normales, almacenándolo en viales de 5 ml bajo congelación a -20°C (tercera modificación). Al menos por seis meses hemos comprobado la estabilidad de estos bancos de suero.

Curva de calibración

1. Se preparan tubos de ensayo 12 x 75 mm, numerados de 0 a 9, a los cuales se les adiciona cantidades crecientes de suero (0,0 a 0,9 ml), ajustando luego a un volumen final de 1 ml con solución salina. Finalmente se adiciona 1 ml de la solución de CNMHb o MetHb. Mezclar bien e incubar 15 minutos en un baño con tapa a 25°C (ver marcha analítica en Cuadro 1).

CUADRO 1

MARCHA ANALITICA PARA LA REALIZACION DE LA CURVA DE CALIBRACION DE Hp

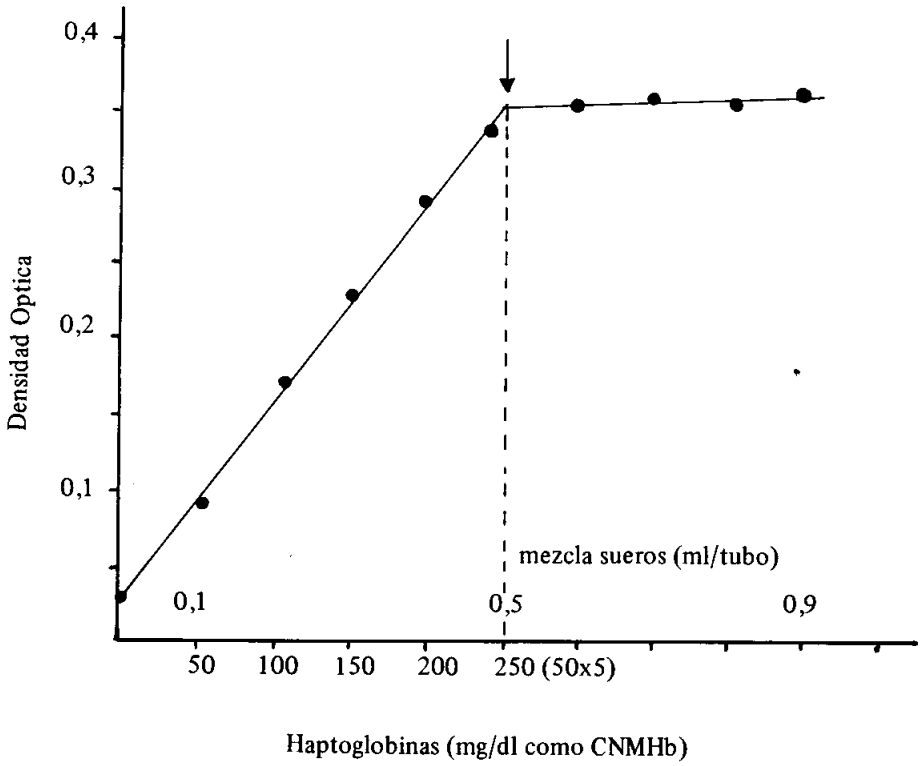
	Número del tubo									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Solución salina	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Banco de sueros	–	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
Solución CNMHb o MetHb	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

2. En 11 tubos numerados de igual forma (0-10), pipetear 2,5 ml de la solución de guayacol. El tubo 11 corresponde al blanco de reactivos. Colocar todos los tubos en el baño a 25°C.
3. A los 15 minutos, tomar una alicuota de 50 μl de cada uno de los tubos 0-9 (con las mezclas de suero + CNMHb) y colocarlos en los correspondientes tubos con el reactivo de guayacol. Al tubo 10 (blanco de reactivos) añadir 50 μl de sol. salina. A intervalos de 30 segundos, adicionar a los tubos de reacción 500 μl de la solución de trabajo de H_2O_2. Mezclar bien por inversión y dejar luego en reposo los tubos por 8 minutos en el baño a 25°C.
4. Cumplidos los 8 minutos de reacción para todas las mezclas reactivas, sacar los tubos con el mismo intervalo de 30 segundos, estando previamente calibrado el espectrofotómetro a cero de D.O. con el blanco de reactivos y a 470 nm. La lectura de las soluciones de cada dilución reactivante no debe pasar los cuatro minutos luego del período de incubación de ocho minutos; de otra suerte, se obtendrá una disminución de la D.O. al perder color la reacción. Igualmente, los tubos no deben exponerse a la luz intensa antes de que se hagan las lecturas, pues el producto coloreado es inestable.

5. Haciendo uso de papel milimétrico plotear los valores obtenidos en la siguiente forma: en el eje de las ordenadas las D.O. y en las abscisas los volúmenes de suero. Se obtendrá una curva semejante a la que se muestra en el Gráfico 1. La curva que se traza es la de mejor ajuste, ya sea visual o matemáticamente (esta última con el uso de la ecuación de una línea recta, y = mx + b) utilizándose los 6 primeros puntos antes de que la curva se aplane. A este nivel vemos que al trazarla los puntos muestran un aumento lineal y luego un punto de inflexión brusco, el cual corresponde justamente al volumen de suero mezclado no diluido que basta para fijar toda la CNMHb adicionada (50 mg/dl). La abscisa correspondiente a este punto de inflexión representa el nivel sérico de haptoglobinas (50 mg/dl), expresado como CNMHb fijada. Como los sueros problemas son diluidos 1:5 el valor extrapolado es de 250 mg/dl. En las abscisas, entre el origen y el punto correspondiente a 250 mg/dl, se marcan intervalos de 25 mg/dl. Luego las lecturas problema se compararán con la porción lineal de la curva de calibración. De otra forma se puede obtener un factor de calibración (FC), dividiendo 250 mg/dl entre el número total de cuadros que se hallan desde el punto cero al punto de inflexión.

GRAFICO 1

CURVA DE CALIBRACION DE Hp
METODO OWEN *ET AL.* (27) MODIFICADO



Procedimiento (micrométodo):

1. Hacer una dilución 1:5 del suero problema con solución salina (100 ul + 400 ul sol. salina). En cada uno de dos tubos 12 x 75 mm marcados PI (paciente) y BI (blanco), pipetear 100 μl de esa dilución. En el tubo marcado PI adicionar luego 100 μl de la solución de CNMHb, y el tubo marcado BI 100 μl de agua desionizada. Incubar ambos por 15 minutos a 25°C en un baño de agua provisto de una tapa.
2. En el baño de agua a 25°C, se colocan dos tubos 16 x 100 mm marcados P y B. En ambos se pipetea 2,5 mI de la solución de guayacol, dejándolos en reposo por 10 minutos. Colocar también en el baño un tubo con la solución de H_2O_2 para que se equilibren las temperaturas.
3. Al cumplirse los 15 minutos de incubación, al tubo marcado P (conteniendo el guayacol) añadir 50 μl de la mezcla suero-CNMHb (tubo PI) y al tubo B 50 μl de la mezcla suero y agua (tubo BI). De inmediato, se añade 500 μl de la solución de H_2O_2 que está en el baño, mezclando por inversión tres veces y poner en marcha el reloj (en el caso de tener varias muestras se agrega el peróxido a intervalos de 30 segundos, teniendo presente que sacarán del baño a ese mismo intervalo). Colocar la tapa del baño e incubar por ocho minutos. Durante el período de incubación se establece el cero del espectrofotómetro con agua destilada a 470 nm (con un instrumento de tipo filtro puede utilizarse uno azul).
4. Leer la D.O. del tubo P y de B, luego de los 8 minutos de incubación. Para los cálculos restar la D.O. del blanco a la del problema, y el valor obtenido llevarlo a la curva de calibración, buscando la 0.0. e interpolando al eje de las abscisas. Obtener el valor directamente en esta, o bien determinar el número de cuadros para el suero problema, multiplicando por el Factor de Calibración (FC) que mencionáramos en la curva de calibración (mg/dl de Hp = FC X N^Q de cuadros). El método no es sensible para valores menores de 10 mg/dl. En tales circunstancias se recomienda usar el suero sin diluir, obteniéndose directamente el valor. Por otro lado, si el valor inicial de una incógnita sobrepasa los 250 mg/dl, debe hacerse una dilución conveniente que permita una lectura dentro del rango de la calibración (0-250 mg/dl).

Resultados y comentarios

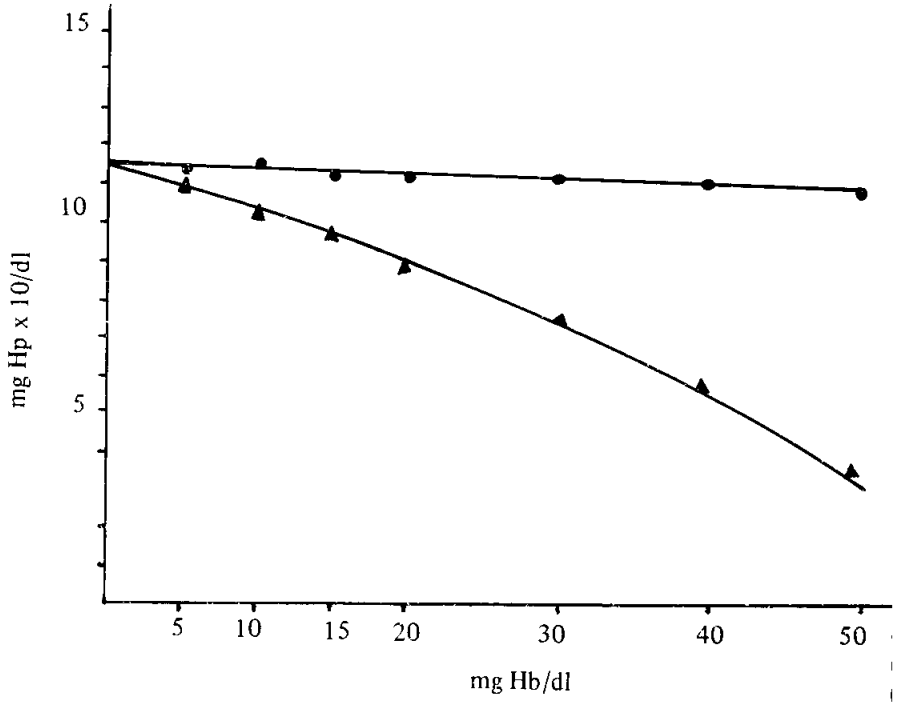
Efecto de la concentración de Hb libre (hemólisis *in vitro)* sobre los niveles séricos de H p:

Para estos efectos se prepararon mezclas de sueros a los cuales se les determinó su valor de Hp, escogiéndose aquella mezcla con una concentración de Hb menor de 1 mg/dl. Posteriormente se preparó un hemolizado con una concentración de 5 g/dI. A ocho tubos con una alícuota de suero se agregaron volúmenes crecientes del hemolizado de tal forma que se obtuvieran concentraciones de 0,5, 10, 15, 20, 30, 40 y 50 mg/dl de Hb, dejándolos luego en reposo por un período de 2 horas (que debe ser el tiempo máximo que debe pasar el suero antes de su separación del coágulo). A cada tubo con la mezcla de suero y Hb se le cuantificó las Hp, utilizándose para los cálculos el procedimiento están dar de restar la D.O. del blanco de suero de cada dilución a la D.O. de cada una de las mezclas, como también sin realizar dicha operación, obteniéndose como resultado lo que se observa en el Gráfico 2.

Como se podrá observar, en las determinaciones realizadas con el procedimiento estándar (D.O. tubo x - D.O. de su blanco) las variaciones en el valor de las Hp van desde el valor del pool (115 mg/dl) a una disminución paulatina de las Hp conforme aumenta la

GRAFICO 2

EFECTO DE LA CONCENTRACION DE Hb LIBRE
(HEMOLISIS IN VITRO)
SOBRE LOS NIVELES SERICOS DE Hp



● Valores de Hp leídos sin restar el blanco de suero.
▲ Valores de Hp leídos con substracción del blanco de suero.

concentración de la Hb añadida. En tanto, si se elimina el blanco de suero de cada uno de los tubos, las variaciones son mínimas. Por tales motivos se debe eliminar el blanco del suero en aquellas muestras incógnitas en las que la hemólisis es visible (>40 mg/dl). De otra forma se obtendrán valores falsamente disminuidos.

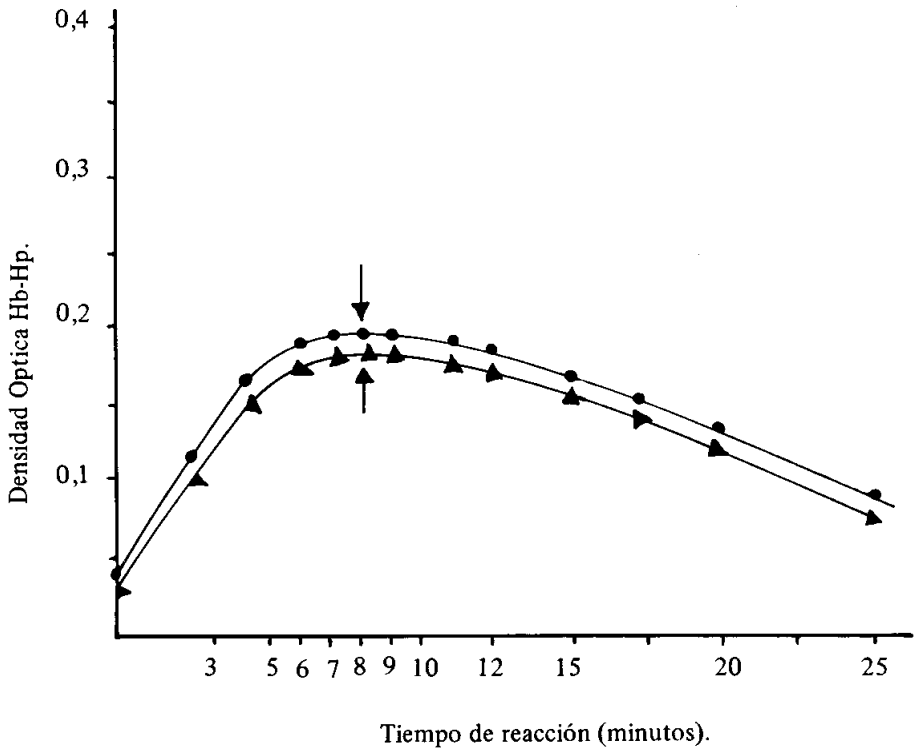
Tiempo mínimo de reacción:

En vista de que modificamos la preparación del estándar primario (MetHb) usando en su lugar la modificación con CNMHb, procedimos a medir la reacción peroxidásica de un pool de sueros (como muestra patrón), desde el momento mismo en que agregamos el

H_2O_2 y hasta por 25 minutos, obteniéndose los resultados que se aprecian en el Gráfico 3. Se infiere de esos resultados que el valor máximo de D.O. se alcanza a los 8 minutos para ambas soluciones, siendo bastante estable el color por 4-5 minutos. Estos datos concuerdan con el período de incubación y el tiempo máximo de lectura recomendados por los autores del método original (19). No dejamos de mencionar que luego de aquel tiempo ocurre una disminución de la D.O. a niveles altamente significativos.

GRAFICO 3

CINETICA DE LA REACCION DEL COMPLEJO PEROXIDASICO METHb-Hp (●) y CNMHb-Hp (▲)

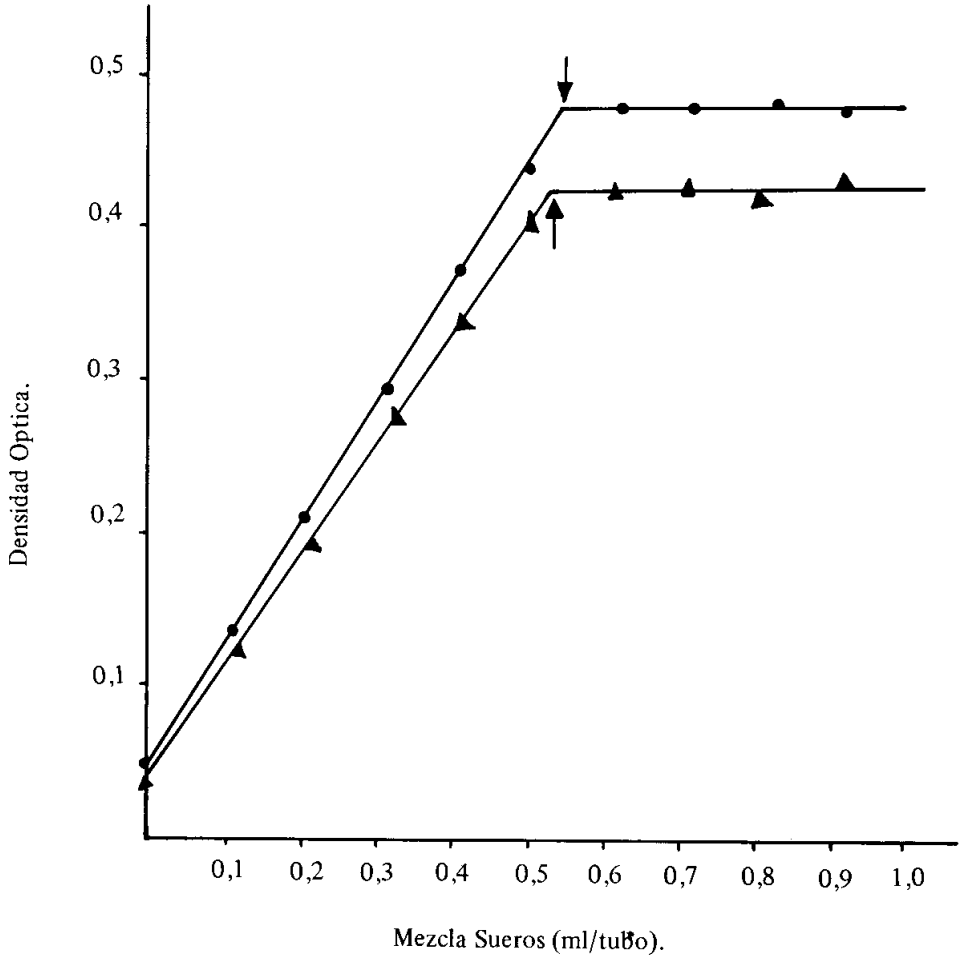


Efecto del uso de CNMHb en vez de MetHb en la estandarización:

Realizamos una curva de calibración para cada una de las soluciones estándares primarias (CNMHb y MetHb), ambas preparadas a partir de un mismo hemolizado (1,0 g/dl). Al graficarlas se encontró lo que se muestra en el Gráfico 4, en donde observamos que los puntos de inflexión son bastante coincidentes y sus pendientes son prácticamente iguales. Ello demuestra que la actividad peroxidásica del complejo CNMHb-Hp es muy semejante a la formada por MetHb-Hp del método original.

GRAFICO 4

ESTANDARIZACION DE LA CURVA DE CALIBRACION DE Hp
UTILIZANDO CNMHb (●) y MeTHb (▲)



Reproducibilidad de la curva

Para estudiar este aspecto se tomó como punto de control el volumen de 0,3 ml de suero (equivalente a 130 mg/dl) de Hp) de la misma mezcla con que se realizó la curva estándar. Para determinar la reproducibilidad de la curva, cada 7 días se comprobó dicho punto con el uso de los reactivos utilizados en la confección de la curva original, obteniéndose los resultados expresados en el Cuadro 2.

CUADRO 2

REPRODUCIBILIDAD DE LA CURVA DE CALIBRACION PARA Hp MEDIANTE EL USO DE UN PATRON CONOCIDO (130 mg/dl) Y DOS SOLUCIONES PRIMARIAS

Solución Primaria	Densidad Optica (Días)							
	0	7	14	21	28	$\bar{X}$	D.S.	C.V.
MetHb	,266	,260	,255	,279	(,104)*	,264	,009	3,4
CNMHb	,299	,288	,283	,288	,290	,289	0,006	2,0

* Solución desnaturalizada. No se incluye el valor en los cálculos estadísticos.

De los resultados obtenidos podemos inferir que la variación de la D.O. del patrón en el tiempo es bastante pequeña, no produciéndose variaciones significativas en la curva precalibrada y por ende en los valores que de ellas se derivan al trabajar muestras incógnitas. Podemos concluir que mediante controles apropiados, la curva previamente calibrada para Hp se puede utilizar por un mínimo de 28 días luego de establecida, cumpliéndose esto para la CNMHb no así para la MetHb, con la cual se apreció reproducibilidad sólo durante 21 días. Por lo tanto, el uso de CNMHb permite el uso de este método como procedimiento rutinario para la medición de Hp denttro de las condiciones analíticas que hemos señalado. Hacemos hincapié en el sentido de que la curva se debe realizar de nuevo en aquel momento en que las diferencias de absorbancia de la solución primaria sean altamente significativas entre una semana y otra, así como cuando se preparen nuevos reactivos.

Efecto del uso de suero o plasma normales en la cuantificación de Hp, con el uso de las dos soluciones primarias (CNMHb y MetHb).

En esta experiencia se logró obtener valores normales para Hp tanto en suero como en plasma, con el uso de las dos soluciones primarias (Cuadro 3). Se puede apreciar que no existe diferencia significativa al utilizar CNMHb o MetHb para la determinación de Hp ($p > 0,05$, $n = 25$) cuando se utiliza suero, siendo compartida dicha información con el uso de plasma ($p > 0,05$, $n = 25$) por lo que en caso de no poseerse suero, tal y como lo recomienda el método original, se puede recurrir a plasma, debido a que los valores obtenidos entre ambos, bajo las condiciones de esta experimentación no son estadísticamente diferentes ($p > 0,05$). Al calcularse diversos coeficientes de correlación se logró demostrar muy buena correlación entre las diferentes combinaciones de suero con CNMHb y suero con MetHb, que fue 0,92, mientras que la de plasma con CNMHb versus plasma con MetHb lo fue de 0,84, la combinación suero-plasma con ambas soluciones primarias mostró una excelente correlación de 0,9.

CUADRO 3

VALORES NORMALES DE Hp EN SUERO Y PLASMA, CON EL USO DE DOS SOLUCIONES PRIMARIAS

Material	Estándar Primario	x̄ (mg/dl)	D.S. (mg/dl)		
Suero	CNMHb	96,6	38,5	$p > 0,05$	$p > 0,05$
	MetHb	97,0	38,5		
Plasma	CNMHb	92,3	33,4	$p > 0,05$	
	MetHb	92,4	34,6		

Discusión

La función primaria de la Hp es unirse irreversiblemente con la Hb libre (complejo HbHp) tanto *in vitro* como *in vivo.* Su papel vital, es por lo tanto, evitar la pérdida de hierro por vía urinaria (26).

En la mayoría de los casos los bajos niveles de Hp se deben a hemólisis y a un rápido aclaramiento del complejo Hb-Hp. Una reducción de la sobrevida eritrocítica a la mitad de lo normal puede resultar en valores muy bajos de Hp (4). La eritropoyesis ineficaz puede originar los mismos resultados. La hemólisis intravascular, aún si es mínima, a menudo se asocia con ahaptoglobinemia. La Típica anemia hemolítica extravascular de la esferocitosis hereditaria, también se asocia con valores bajos de Hp (27). Por estas y otras razones no es posible una correlación entre el contenido plasmático de Hp y la severidad de la hemólisis.

Una buena y útil aplicación del procedimiento es en la diferenciación de hemoglobinuria y mioglobinuria, ya que esta última no se une a la Hp (7). Las variaciones patológicas en los niveles de Hp, se encuentran en varias enfermedades. La concentración de Hp se eleva en toda reacción de fase aguda y en el síndrome nefrótico (6). En caucásicos, después del primer año de vida, la ausencia o bajos niveles indican hemólisis o daño hepatocelular agudo (12).

En las enfermedades hepáticas los niveles de Hp 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 Hp y a un incremento en los niveles de estrógenos (3). Owen *el al* (19) han encontrado valores bajos de Hp en enfermedades hepatocelulares y altos en obstrucción biliar y carcinomatosis secundarias.

Con base en el fundamento del método que preconizamos, la sangre de cordón umbilical de recién nacidos a término contiene menos de 10 mg/dl (2), siendo la Hp de origen fetal, en vista de las diferencias fenotípicas de Hp entre madre e hijos. Esta conclusión se ve apoyada por el hallazgo de que los recién nacidos pueden incrementar significativamente su contenido plasmático de Hp en respuesta a infección (11). Luego del nacimiento hay un aumento gradual en la capacidad de unión de la Hb con el suero, alcanzándose los niveles característicos del adulto entre los 3 y 12 meses (2). Particularizando los resultados que aquí se consignan como parte de la investigación llevada a cabo, los niveles normales de Hp séricas o plasmáticas, son muy semejantes a lo que otros autores han reportado. Vemos así cómo con el método de Owen *et al.* (19), utilizado en el presente trabajo, Lynch *et al.* (14) reportan un valor medio de 100 mg/100 ml, siendo el nuestro de 94,6 mg por ciento. Shinton *et al.* (28), señalan márgenes de 33 a 213 mg por ciento, y Roy *et al.* (26) de 40 a 188 mg por ciento, con una media de 96 mg por ciento, mientras nuestros hallazgos indican valores extremos de 42,0 a 167,4 mg por ciento.

Se acepta en general que es estequiométrica la reacción de la Hp 1-1 con la Hb para formar un complejo totalmente saturado; una hemimolécula o dímero alfa-beta de Hb se une a cada subunídad alfa-beta de Hp. Esta razón equimolar parece que se mantiene al menos para los pequeños polímeros de los fenotipos Hp 2-2 y Hp 2-1. Si el impedimento estérico en los polímeros más grandes lleva a una razón Hb:Hp baja, tal y como ha sido sugerido (8), esto permanece por ser determinado o definido (11).

Aunque la capacidad de combinación de la Hb con la Hp está aparentemente relacionada con el fenotipo de esta (11, 21, 29), las diferencias no son tan marcadas como para que globalmente el método peroxidásico pierda valor clínico (12), tal y como se ha demostrado con este método (5) al observarse que la máxima actividad peroxidásica es independiente del tipo de Hp que se use para la estandarización. En todo caso los valores bajos son comunes entre individuos del fenotipo Hp 2-2, y normales altos en el Hp 1-1 (18).

La medición de Hp por el método peroxidásico ha sido avalada por muchos trabajos de investigación (5, 19,20,22,29). Nuestro trabajo permite también exaltar las bondades del método, el cual hemos modificado a fin de darle un sentido más práctico y útil al analista, por los siguientes motivos: a) una estandarización más clara de toda la metodología con una lectura directa de las incógnitas; b) una mayor preservación de los reactivos, lo cual permite prepararlos cada dos o tres meses. Se destaca en especial la buena estabilidad del guayacol bajo condiciones de congelación y el uso de un están dar de CNMHb que prácticamente no caduce, en vez de la solución de metaHb que es estable unas pocas semanas; c) uso de la curva de calibración por más de un mes, si se reiteran en las determinaciones de incógnitas realizadas en un día determinado, las lecturas de uno de los puntos de aquella (por ejemplo: el estándar de 0,3 ml, correspondiente al tubo 4 de la curva); d) uso indiferente de suero o plasma para la medición de la capacidad de combinación de la Hp; e) eliminación del blanco de suero en muestras con evidente hemólisis visual; f) uso de pequeños volúmenes de suero o plasma (0,1 ó 0,2 ml) lo que le da carácter de micrométodo al procedimiento.

ABSTRACT

We have modified Owen et al 's peroxidation methodology for haptoglobin quantification, in order to simplify it and reduce costs. Among

the principal changes we introduce are a greater reagent stability, the use of a CNMHb primary standard, the correction of the results according to the evidence of spureous hemolisis, its micromethod character and the use of a simple calibration proceedure that permits the use of the same calibration curve for up to one month.

Bibliografía

1. Atmetlla F., Sáenz G. F. y Jiménez J. Estimación cuantitativa de haptoglobinas séricas en adultos normales de ambos sexos. *Acta Méd. Cost.* 1972; 15: 175-187.

2. Bergstrand C. G., Czsr B., Tarukoski P. H. Serum haptoglobin in infancy. *Scand. J. Clin. Lab.* Invest. 1961; 13:576-582.

3. Blumberg B. S. Clinical significance of serum haptoglobins**.** In: F.W. Sunderman y F. W. Sunderman Jr., *Hemoglobins. its precursors and metabolits.* J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 1964; 318-324.

4. Brus l., Lewis S. M. The haptoglobin content of serum in haemolytic anaemia. *Br. J. Haemat* 1959; 5: 348-355.

5. Connell G. E. Smithies O. Human haptoglobins: estimation and purification. *Biochen. J.* 1959; 72: 115-121.

6. Henry J. B. *Clinical diagnosis and management by laboratory methods.* Vol. I. 16nd. Edit.; W. B. Saunders, Co., Pa., 1979; 243, 244, 250, 326,1017.

7. Javid J., Fisher D. S., Spaet T. H. Inability of haptoglobin to bind myoglobin. *Blood* 1959; 14:683-687.

8. Javid J. The effect of haptoglobin polymer size on hemoglobin binding capacity. Vox Sand. 1965; 10: 320-325.

9. Javid J. Haptoglobin 2-1 Bellevue, a haptoglobin B- chain mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA, 1967; 57:920-924.

10. Javid J., Yingling W. Irnmunogenetics of human haptoglobins. I. The antigenic structure of normal Hp phenotypes. *J. Clin. Invest.* 1968; 47:2290-2296.

11. Javid J. Human haptoglobins. In: *Current Topics in Hematology.* Alan R. Liss, Inc., N. Y. 1978; 1:151-192.

12. Kachmar J. F., Grant G. H. Proteins and aminoacids. In: Tietz, E. *Clinical chemistry,* 2nd Edit., 1976; 343-344.

13. Lionetti F. J., Valeri C. R., Bond J. C., Fortier N. L. Measurement of hemoglobin-binding capacity of human serum or plasma by means of dextran gels. *J. Lab. Clin. Med.* 1964; 64:519-522.

14. Lynch M. J., Raphael Mellor L. O .. Spare P. D., Inwood M. J. H. *Medical Laboratory Technology and Clinical Pathology* 2nd Edit. J. B. Saunders Co., Pha., USA, 1969;470-471.

15. Malin S. F., Baker R. P. Electrophoretic determination of haptoglobin as a hemoglobin complex. *Biochem. Med.,* 1972; 6:205-209.

16. Moretti J., Yon J. Etude cinétique de L'activité peroxidasique du complexes hemoglobine haptoglobine. *Biochim. Biophys Acta* 1961; 46: 545 -554.

17. Murray R. K., G. E. Connell, J. H. Pert. The role of haptoglobin in the clearance and distribution of extracorpuscular hemoglobin. *Blood* 1961; 17:45-53.

18. Nyman M. Serum haptoglobins. Methodological and clinical studies. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1959; 11 (Suppl. 39):1-169.

19. Owen J. A., F. C. Better, and J. Hoban. A simple method for the determination of serum haptoglobins. *J. Clin. Path.* 1960; 13:163-164.

20. Owen J. A., De Gruchy G. C. Smith H. Serum haptoglobins in haemolytic states. *J. Clin. Path.* 1960; 13:478-482.

21. Planas J. J. Viñas, S. de Castro, J. M. Arribas, M. C. Martin-Mateo. The values of haptoglobins and their relation to the genetic type in a group of donors. *Rev. Esp. Fisiol.* 1965; 21:15-20.

22. Phillip A. G. S. Haptoglobins in the newborn. *Biol. Neonate* 1971; 19:322-326.

23. Ramakers J. M., Krentzer H. J. H. Turbidimetric determination of haptoglobin. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem* 1976; 14:407-410.

24. Ramírez M. J., Ruiz-Reyes G. Pérez C. L. Procedimiento rápido para cuantificar haptoglobina sérica por electroforesis en acetato de celulosa. *Sangre* 1971; 16: 127 -131.

25. Robson E. B., Polani P. E., Dart S. J., Jacobs P. A., Renwick, J. H. Probable assignment of the alpha locus of haptoglobin to chromosome 16 in man. *Nature* 1969; 223:1163-1165.

26. Roy R. B., R. W., Saw G. E., Connell. A simple method for the quantitative determination of serum haptoglobin. *J. Lab. Clin. Méd.* 1969; 74:698-704.

27. Sáenz G. F., Orlich J, Chaves M., Montero G., Jiménez J., Azofeifa B. y Muñoz R. Observaciones sobre una familia con esferocitosis hereditaria y revisión de la literatura. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* 1981; 2: 17 -28.

28. Shinton N. K., R. W. Richardson, J. D. F. Williamns. Diagnostic value of serum haptoglobins. *J. Clin. Path.* 1968; 18:114-118.

29. Smith H., Owen. J. A. The determination of haptoglobins in normal human serum. *Biochem. J.* 1961; 78:723- 728.

30. Smithies O., Walker N. F. Notation for serum protein groups and the genes controlling their inheritance. *Nature* 1965; 178:694-695.

31. Smithies O. An improved procedure for starch gel glectrophoresis: Further variations in the serum proteins of normal individuals. *Biochem. J.* 1959; 71:585-587.