

## HIERRO SERICO Y TRANSFERRINA FUNCIONAL (CAPACIDAD TOTAL DE FIJACION DE HIERRO) PRECONIZACION DE UNA METODOLOGIA

German F. Sáenz R., Mario Chaves V., Guido Arroyo S.,  
Dr. Eliecer Valenciano V., Javier Jiménez A., Alberto G. Montero P.  
y Eugenia Quintana G.

Key word Index: Serum iron, transferrin, methodology

### RESUMEN

Los autores preconizan una metodología para FeS y CTF (transferrina funcional) basada en los métodos de Beale et al. y de Ramsay, la cual sustancialmente han modificado Loría y Monge, y a la que nosotros le hemos introducido algunas pocas variantes luego de más de 10 años de experiencia con la misma. Para FeS el fundamento estriba en separar el  $Fe^{+3}$  de la transferrina sin proceder con desproteínización al hacer uso de un tampón ácido de glicina, ácido ascórbico como reductor y batofenantrolina como cromógeno. La CTF se realiza utilizando  $MgCO_3$  como absorbente del  $Fe^{+3}$  que en exceso saturó previamente a la T, separando ésta última sea por centrifugación o por un original método en columna-centrifugación. Para ambos procedimientos se indican una serie de detalles técnico-analíticos propios de la experiencia de los autores, como de recientes recomendaciones que al respecto han señalado el International Committee for Standardization in Haematology (ICSH).

### INTRODUCCION

A partir del descubrimiento de Schade y Caroline (30) por el que caracterizaron a la globulina plasmática transportadora de  $Fe^{+3}$  (Transferrina (T), Siderofilina), se han desarrollado muchos métodos para evaluar su concentración y la capacidad del suero de combinarse con dicho metal (CTF), toda vez que uno de los factores limitantes de la eritropoyesis es la cantidad de hierro que llega a la médula ósea vía transferrina (T), en especial de su grado de saturación (16). Esta proteína de transporte de  $Fe^{+3}$ , de carácter glicoproteico y  $\beta_1$  globulínico, presenta un marcado polimorfismo genético, conociéndose más de 21 variantes (5).

Químicamente posee 676 residuos de aminoácidos en unión de dos cadenas de carbohidratos, lo que le da un peso aproximado de 81000 daltones (17). Los residuos se organizan en una simple cadena polipeptídica; con dos sitios de combinación para el Fe, cada uno para un átomo férrico, sin que a la fecha se conozca la localización exacta de esos sitios de combinación férrica. Cerca del 6% de la T son carbohidratos que logran formar dos cadenas ramificadas que terminan en ácido siálico. Dependiendo del grado de saturación, la T tiene uno (monoférrica) o dos receptores (diférrica) saturados con  $Fe^{+3}$ . La proporción de una y otra T depende únicamente del porcentaje de saturación (6). En estudios *in vitro* el hierro de la T diférrica es captado más rápidamente por los eritroblastos, reticulocitos y placenta que el hierro de la T monoférrica (12, 17). Esto explica la diferencia en el aclaramiento plasmático de ambas, siendo el de la diférrica más rápido que el de la monoférrica (6, 11). A su vez, la saturación de la T depende de los tejidos donantes

de hierro (mucosa intestinal, sistema reticuloendotelial y parénquima).

En el plasma habrá, pues, apoT (CLF), T-monoférrica y T-diférrica. Conforme la apoT se fija tenazmente con átomos de  $Fe^{+3}$  su forma incolora se va tornando en un complejo de color salmón, imperceptible a la vista, pero medible espectrofotométricamente (10, 30).

En la práctica clínica, el índice de saturación de la transferrina (IS) es de gran utilidad para conocer el estado de los depósitos de hierro (2). Aunque con la determinación aislada del IS no se puede usualmente diferenciar entre anemia ferropénica y anemia de la enfermedad inflamatoria crónica, la facilidad de su realización, así como su bajo costo, la hacen superior, como técnica de rutina a la determinación de la ferritina sérica (7).

La capacidad total de fijación del hierro (CTF) es la medida funcional de la T. Según el método que aquí se preconiza, se realiza mediante la saturación del suero con un exceso de hierro, se elimina posteriormente el hierro no fijado a la T con un absorbente y por último se mide el hierro que queda, que es el retenido por la T.

La vida media de la T es de aproximadamente 10 días, en tanto que el del FeS es de 60 a 120 minutos (34). El valor normal de la T Funcional (CTF) se halla entre 290 y 360 ug/dl (52-65 umol/L), una concentración capaz de transportar aproximadamente 300 ug/dl de Fe (aproximadamente 60 umol/L) (10). La capacidad de fijación de Fe de la T, normalmente es sólo de una tercera parte (un mg de T se une a 1,25 ug de Fe), por lo que el FeS es del orden promedio de los 100-120 ug/dl para una CTF de unos 330 ug/dl. El IS indica la cantidad de Fe presente en el suero, con relación a la cantidad de T. Este porcentaje de saturación es un índice mejor del estado de las reservas de Fe que el valor aislado del FeS. No hay variaciones diurnas en los niveles de la T(34), pero sí los hay del FeS, al observarse una considerable variación circadiana con un pico matutino y una depresión de los valores al anochecer (20), debido principalmente a variaciones en la donación de Fe a la T por parte de las células del sistema retículo-endotelial o sistema mononuclear fagocítico. En este sentido, se ha reportado que el FeS puede ser una tercera parte más alto en la mañana que en la noche (34), motivo por el cual el diagnóstico de deficiencia de Fe debe efectuarse en especímenes tomados en condiciones de ayuno matinal.

Al igual de lo que sucede con la albúmina, pero contrario de lo que acontece con la mayoría de las glicoproteínas plasmáticas, la T decrece en los procesos inflamatorios crónicos (34). Un incremento en los valores de la T se encuentra no solamente cuando las reservas corporales de Fe están disminuidas o depletadas, sino también en el embarazo-aún cuando no haya deficiencia de Fe- y en mujeres que toman contraceptivos estrogénicos (5, 29). Durante el embarazo, se registran cambios considerables en las proteínas plasmáticas a raíz de fenómenos hormonales propios de la gravidez (29). La elevación de la T en esta condición no debe, pues, tomarse como parámetro para el diagnóstico de deficiencia de Fe o de anemia ferropriva. Es de más confianza el hallazgo de una baja concentración de FeS para esos fines, aunque para establecer el diagnóstico con un margen razonable de seguridad se precisa determinar el Fe de reserva (29). Elizondo, *et al.* (9) no pudieron demostrar ninguna correlación entre la CTF y la protoporfirina eritrocítica libre durante el embarazo, en mujeres con o sin suplemento de Fe. Nannie *et al.* (22) consideran que la determinación de la protoporfirina es útil solamente en casos de deficiencia tardía de Fe.

La medición inmunológica directa de la T (electroinmunoensayo o inmunoprecipitación) da valores ligeramente inferiores a lo que mide la CTF (21), en vista de que el Fe se une también a otras proteínas cuando la T se halla más de la mitad saturada en las pruebas *in vitro*. Esta sobreestimación de la T, por el método indirecto, puede ser de un 10 a

20 por ciento (10) o de un 5-10 por ciento (15). Celada *et al.* (7), en un estudio comparativo de la medida de la T y de la CTF en varios grupos de individuos con diversos cuadros clínicos, encontraron que la CTF era significativamente elevada en comparación con la T medida inmunológicamente (inmunodifusión radial), siendo esta diferencia más acentuada en el caso de pacientes embarazadas. Demostraron, asimismo, una buena correlación entre la T y la CTF en todos los grupos estudiados, siendo también muy parecidos los coeficientes de correlación en cada grupo, lo que sugiere que la medición de la cantidad de T equivale a medir la actividad funcional de la T, es decir, a la CTF. Por otra parte, los autores encontraron que el LS de la T, obtenido a partir de la CTF, mostró una correlación excelente en todos los grupos, con el mismo índice obtenido con la medición inmunológica de la T. Los autores llegaron a la conclusión, por otros estudios *in vivo* con animales de experimentación, que los valores de T obtenidos con el método de la CTF, corresponden más a la realidad que los obtenidos con la medición inmunológica de la T. Previamente, Martinek (21) ya había citado el hecho de que los métodos inmunológicos dan valores más bajos para T que los colorimétricos o isotópicos.

### INTRODUCCION METODOLOGICA:

El interés creciente en torno al metabolismo y transporte del hierro (Fe) en el hombre, ha provocado la necesidad de establecer métodos exactos, sensibles y reproducibles para la determinación tanto del hierro sérico (FeS) como de la proteína que lo transporta, la transferrina (T), sea que la medición de ésta se haga en forma directa o indirectamente como la capacidad latente de fijación CLF) o como capacidad total de fijación (CTF), vale decir, de T funcional. A partir de 1950, se han establecido varios procedimientos que bien pueden considerarse analíticamente correctos, escapando al interés de esta comunicación señalar la abundante literatura que existe al respecto. En términos generales, todos incluyen tres fases analíticas: separación del  $Fe^{+3}$  de la T, reducción del  $Fe^{+3}$  a  $Fe^{+2}$ , y por último, reacción del  $Fe^{+2}$  con algún cromógeno. Beale *et al.* (3) propusieron, en 1961, tratar el suero con un tampón de acetato, que incorpora ditionito de sodio como reductor simultáneo, con lo cual evitaban el uso de la precipitación de proteínas y calentamientos que otros métodos exigían. Posteriormente, los mismos autores (4) introdujeron una variante en esta primera fase de la marcha analítica, al substituir los dos reactivos mencionados por un tampón ácido de glicina, pH 1.9, que lleva incorporado como reductor el ácido ascórbico. Otros reductores que se han utilizado son la hidrazina, ditionito, sulfito de sodio y, especialmente, hidroxilamina y ácido tioglicólico (21-32). Varios cromógenos se han propuesto para la reacción de color con el  $Fe^{+2}$  liberado de la T. Dentro de ellos los más recomendados (32) por su mayor sensibilidad (dada la alta absorptividad molar del complejo  $Fe^{+2}$ -cromógeno) son la batofenantrolina (4, 7-difenil-1, 10-fenantrolina) o su forma sulfonatada soluble en agua; la ferrozina ( [ 3 (2-piridil)-5, 6-bis (4-fenil) ácido sulfónico ], y la terosita [ 2,6-bis (4-fenil-2, 2-piridil) -4-fenil piridina ]. El método de referencia que ha recomendado el International Committee for The Standardization of Haemoglobin ICSH (13, 15, 18) también preconizado como método seleccionado para rutina, se basa en el uso de la precipitación de las proteínas con ácido tricloroacético, separación del  $Fe^{+3}$  de la T con el uso de HCl diluido y reducción simultánea del  $Fe^{+3}$  a  $Fe^{+2}$  con ácido tioglicólico. Para la reacción cromogénica con el  $Fe^{+2}$ , recomiendan la batofenantrolina sulfonatada. Asimismo, el ICSH recomienda un estándar de  $Fe^{+3}$  preparado a partir de alambre de Fe seco y lustrado (pureza no menor del 99.5 por ciento), con una solución de trabajo que contiene 40  $\mu\text{mol/L}$  (2,24  $\mu\text{g/ml}$ ). Esta metodo-

logía corresponde en mucho al método original de Peters *et al.* (24) con el cual, Noguera y Sáenz (23) pudieron establecer valores normales de FeS en Costa Rica en 1967.

En el presente trabajo, no se va a preconizar este procedimiento de referencia, por cuanto hemos decidido substituirlo por otro de menos costo que no utiliza desproteinización, que es más rápido, y que se basa en algunas modificaciones introducidas por Loría y Monge (2), al método de Beale *et al.* (4), en unión de algunas observaciones por parte de M.S. Córdova (Dept. Hematología, Instituto Nacional de la Nutrición, México; comunicación personal) y muy pocas de nosotros.

Contrario de lo que podría pensarse, la espectroscopía de absorción atómica (EAA) presenta limitaciones de sensibilidad, de interferencia por matriz, de incapacidad en distinguir Fe de la Hb de Fe de la T y, obviamente, de costos (21- 32, 34). En contra de este procedimiento, los colorimétricos son más prácticos, rápidos y sensibles (34). Recientemente, (28) se ha propuesto un método de EAA que elimina algunos de los factores interferentes arriba señalados.

El problema relacionado con el establecimiento de un método de referencia para medir la CTF sigue vigente en nuestros días, sea que se pretenda determinarla como tal o como CLF. Existen métodos espectrofotométricos directos para la CLF, tal y como el que en nuestro medio utilizaron Noguera y Sáenz, (23) basado en el procedimiento de Rath y Finch (27); también existe la determinación química directa tanto de la CTF como de la CLF; el uso de Fe radioactivo y de resinas de intercambio iónico (amberlita); saturación del suero con  $Fe^{+3}$  y uso de absorbente tipo carbón activado o  $MgCO_3$ ; uso de la espectroscopía de absorción atómica y medición inmunológica de la T (21).

De los tres absorbentes mencionados, el  $MgCO_3$  es el que debe recomendarse por su bajo costo, su asequibilidad, por estar listo para usarse y por ser intercambiable simultáneamente en estudios isotópicos y colorimétricos (8).

Se debe a Ramsay (25) en 1957, el haber demostrado que el Fe iónico (especialmente el  $Fe^{+3}$ ) era fuertemente absorbido por el  $MgCO_3$ , en tanto que el Fe unido a la T no, e inclusive propuso que cada laboratorio podría preparar un  $MgCO_3$  de buena calidad a partir de  $Na_2CO_3$  y el  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ . El ICSH (14) no ha adoptado todavía una decisión en torno a un método de referencia para CTF; sin embargo ha recomendado el método de adsorción con  $MgCO_3$  de Ramsay como un procedimiento seleccionado, adecuado en general para propósitos clínicos. En el presente trabajo se preconiza un método para medir la CTF que Loría y Monge (19) modificaron de acuerdo con lo propuesto por Ramsay (25), y al cual, nosotros, le hemos introducido pequeñas variaciones, especialmente en la fase de adsorción, como también se han tomado en cuenta algunas recomendaciones emanadas del ICSH (14). Por otra parte, la metodología que aquí se preconiza tiene la bondad de la sanción del tiempo, pues, al menos la modificación de Loria y Monge, la hemos estado realizando con todo éxito desde hace más de 10 años.

## **METODOLOGIA PRECONIZADA**

*HIERRO SERICO* (FeS), de acuerdo con Beale *et al.* (4), modificado por Loría y Monge (19), y por los presentes autores.

### *Fundamento:*

El FeS, o el complejo  $Fe^{+3}$ -transferrina, es estable a pHs por arriba de 7, pero fácilmente disociable por debajo de 5. A fin de aprovechar esta característica, la muestra de

suero se trata con un reactivo tampón de glicina de pH 1.9, que prevee al mismo tiempo la precipitación de proteínas y que lleva incorporado como agente reductor ácido ascórbico.

El  $\text{Fe}^{+3}$  así liberado y reducido a  $\text{Fe}^{+2}$  se hace reaccionar con un agente cromógeno (batofenantrolina sulfonatada), formándose un complejo coloreado insoluble, con un máximo de absorbancia 535 nm (15).

## METODO

Trabajando directamente en cubetas 12 x 75 mm, se sigue la siguiente secuencia analítica:

	Blanco	Patrón	Problema
Sol. salina (ml)	0.5	—	—
Patrón $\text{Fe}^{+3}$	—	0.5	—
Suero	—	—	0.5
Tampón trabajo	1.5	1.5	1.5
<b>M</b>	<b>Mezclar bien; reposo 20 min. a T. ambiente</b>		
	<b>Leer a 535 nm las A-1 del patrón y problema contra blanco</b>		
Batofenantrolina (*)	0.03	0.03	0.03
	<b>Mezclar inmediatamente; reposo 40 minutos</b>		
	<b>Leer a 535 nm las A-2 del patrón y problema contra Blanco</b>		

(\*) Se puede calibrar un pequeño frasco gotero para que entregue una gota de aproximadamente  $0.03 \pm 0.005$  ml.

## Cálculos

Obtener las A netas, restando las A-1 de las A-2 del patrón y del problema, respectivamente.

$$\text{FeS en ug/dl} = \frac{\text{A neta del problema}}{\text{A neta del patrón}} \times 200$$

Notas = este procedimiento puede realizarse a nivel de micrométodo utilizando la mitad de las soluciones y cubetas de 10 x 75 mm, o cuadradas de 1 cm de paso de luz. Asimismo, puede correrse simultáneamente un suero control preparado en el laboratorio (ver comentarios finales) o de tipo comercial.

## Reactivos

- 1.— Solución tampón concentrada de glicina 0.2 M: en un beaker de 200 ml colocar 1,50 g de glicina A.R., y disolverlos en unos 60 ml de agua libre de Fe. Ajustar el pH a 1.9 (1.88-1.92) con HC1 N. Pasar cuantitativamente a un balón aforado de 100 ml y aforar con agua libre de Fe. Mantener bajo refrigeración.
- 2.— Solución tampón de trabajo: a cada volumen de tampón concentrado agregar dos volúmenes de solución acuosa recién preparada de ácido ascórbico al 0,5 por ciento. La inestabilidad de este amortiguador exige su preparación cada vez que se van a practicar determinaciones. El volumen del tampón que se prepara dependerá del número de incógnitas o problemas que se trabajen. Nosotros hemos comprobado que para pequeños laboratorios se puede proceder en la preparación del tampón de trabajo de la siguiente manera: pesar 125 mg de ácido ascórbico y disolverlos en 25 ml de agua desionizada; usar lo que corresponda y congelar el resto a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Al momento de la prueba, preparar el tampón como se mencionó arriba, guardando de nuevo el remanente de la solución de ácido ascórbico bajo congelación para una posterior determinación.
- 3.— Solución de batofenantrolina: colocar 150 mg de batofenantrolina sulfonatada (sal sódica, Sigma No. B-1375) en un balón aforado de 25 ml. Aforar con agua, mezclar y mantener bajo refrigeración.
- 4.— Solución patrón madre de Fe, 1,000 g Fe/L (33): pesar exactamente 1,000 g de alambre de Fe electrolítico (iron wire, Baker, AR, No. 36; Fisher Sci., Co., Cat. No. 1-185) y llevarlo a un frasco de 250 ml que contiene 25 ml de HC1 7 N. Calentar el frasco a ebullición en baño de maría bajo una campana de extracción de gases, con agitación suave a intervalos cortos de tiempo. Luego de la disolución del Fe dejar enfriar y pasar cuantitativamente el contenido del frasco a un balón aforado de un litro y, finalmente, aforar con agua desionizada. El reactivo, bien tapado, es estable indefinidamente. También puede prepararse una solución madre de hierro, de 100 ug/ml, pesando 175,5 mg de sulfato ferroso amónico hexahidratado ( $\text{Fe}(\text{NH}_3)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), los cuales se disuelven en 1,25 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, y aforo final a 250 ml con agua destilada.
- 5.— Solución patrón de Fe de trabajo 2 ug/ml: pipetear exactamente 1,0 ml de la solución patrón madre en un balón aforado de 500 ml y diluir al aforo con agua desionizada. Este patrón es estable por algunos pocos meses (200 ug/dl  $\approx$  5.82 umol/L).

### CAPACIDAD TOTAL DE FIJACION DE HIERRO AL SUERO (Transferrina Funcional; Transferrina Total)

De acuerdo con Ramsay (25, 26), modificado básicamente por Loría y Monge (19) y por los presentes autores, con algunas indicaciones del ICSH (14).

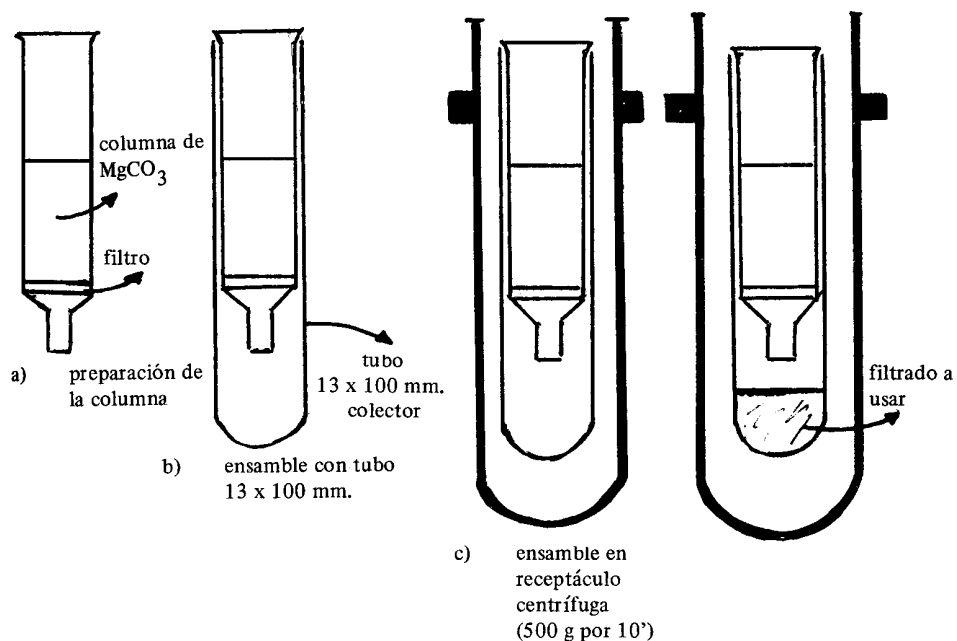
#### Fundamento:

Normalmente una tercera parte aproximada de la T está unida al hierro ( $\text{FeS}$ ) y el resto se halla libre (apoT, CLF). Para la determinación de la CTF, el suero se trata en una primera fase con un exceso de  $\text{Fe}^{43}$ , parte del cual se liga con la ApoT y el remanente (Fe libre en exceso) se remueve por adsorción con  $\text{MgCO}_3$ . Por centrifugación convencional

o con el uso de una columna preparada con el adsorbente, se obtendrá un sobrenadante o un filtrado en su caso que contendrá exclusivamente la transferrina saturada de Fe, determinándose éste (segunda fase) de la misma manera como si fuera FeS, lo que permitirá conocer la CTF o T funcional del suero en estudio.

#### Método:

- 1.— Pipetear 0,5 ml de suero y control en respectivos tubos 12 x 75 mn.
- 2.— Agregar 1,0 ml de la solución patrón de trabajo de Fe (2 ug/ml) a cada tubo, mezclar bien con cuidado y dejar en reposo a temperatura ambiente por 10 minutos. A partir de este punto puede llevarse a cabo la fase de adsorción con  $MgCO_3$  por cualesquiera de las siguientes alternativas:  
Alternativa I(19):
  - 3a.—agregar a cada tubo unos 200 mg de  $MgCO_3$  mezclar vigorosamente, tapan el tubo y dejar en reposo por 5 minutos.
  - 4a.—centrifugar ambos tubos (cabezal vertical) a 3000 rpm por 10 minutos.
  - 5a.—obtener con cuidado 0,5 ml de sobrenadante y colocarlos en una cubeta de 12 x 75 mm.
  - 6a.—medir el Fe del sobrenadante (0,5 ml) siguiendo el método de FeS, como si fuera suero problema. El dato de concentración de Fe obtenido en esta ocasión se multiplica por 3 ya que el suero ha sido diluido 1:2 en la fase primera del proceso. El resultado de esta operación nos dará la CTF en ug/dl.Alternativa II (de White y Flashka (33), modificado por Tietz (31) y los presentes autores):
  - 3b.—preparar de previo una columna de  $MgCO_3$  conteniendo 150 mg; utilizar recipientes de plástico desechables de los que se utilizan en RIA para la medición de  $T_3$  y  $T_4$ , ensamblándose el sistema o unidad de la siguiente manera:



cuidadosamente transferir el contenido total de los tubos en el paso 2 a la columna respectiva de  $MgCO_3$  la cual se halla adaptada al tubo colector; colocar el sistema en el receptáculo de la centrífuga.

- 4b.—centrifugar el sistema columna-tubo colector por 10 minutos a 500 g. Al término de la centrifugación, descartar la columna.
- 5b.—directamente del tubo colector tomar 0,5 ml del filtrado respectivo (problema y control) y colocarlo directamente en la cubeta 12 x 75 mm.
- 6b.—medir el Fe del filtrado como si fuera un suero problema. El dato de la concentración que se obtenga se deberá multiplicar por 3 en vista de que el suero había sido diluido 1:2 en el proceso inicial de saturación de la T con la solución patrón de Fe. Así se obtendrá la CTF en  $\mu g/dl$ .

Notas =

- a) En la versión II se pueden también realizar los cálculos si se corre el patrón de 2  $\mu g/ml$  (0,5 ml) y un blanco (0,5 ml de agua desionizada) directamente en cubeta a partir del punto 5b. Se obtienen las A netas del problema y del patrón y se multiplica por 600 = CTF en  $\mu g/dl$ .
- b) Debe cerciorarse la calidad adsorbente del  $MgCO_3$ . Nosotros hemos trabajado con buen éxito los productos de Sigma (M-0125) y Hycel (No. 299). El ICSH (14) señala también el de Fisher Sci. Corp., Pitt., Pa., USA, y el de Mallinckrodt, St. Louis, USA, como los menos sujetos a variaciones analíticas. En todo caso, el lote de  $MgCO_3$  debe ser del tipo "ligero" (light) y su bondad adsorbente debe ser siempre analizada de previo, de la siguiente manera: hacer una medición de Fe en que se sustituye el problema por solución salina desde el primer paso de la fase de saturación. El sobrenadante o filtrado de salina deberá tener, si acaso, trazas de Fe (19).
- c) En raras ocasiones se puede encontrar sueros anormales en que toda la T se halla unida a Fe, es decir, una saturación del 100 por ciento. En estos casos, el FeS será igual a la CTF. Pero no deben aceptarse resultados en que el FeS sea substancialmente mayor que la CTF. Tal situación indica error en una o ambas determinaciones, o bien la presencia en el suero de hierro tisular o de hierro terapéutico dado por vía parenteral (19).
- ch) Si se carece de propipeta para extraer el sobrenadante (en el paso 5a), y con el fin de evitar tomar precipitado de carbonato, puede decantarse el sobrenadante a un tubo limpio y centrifugar de nuevo. Este recurso es poco recomendable, ya que aumenta el peligro de contaminación con hierro (19). Igualmente, si en el paso 4b de la Alternativa II alguna partícula de  $MgCO_3$  se aprecia en el filtrado, el tubo recolector debe ser de nuevo centrifugado a fin de evitar resultados erráticos.
- d)  $g$  = fuerza centrífuga relativa (FCR). En donde  $g = 0.00001118 \times r \times N^2$   $N$  = a la velocidad de rotación (r.p.m.), y  $r$  = al radio de rotación de la centrífuga en cm. Por lo tanto para convertir la  $g$  en r.p.m. se despeja  $N$ :

$$N = \sqrt{\frac{g}{0.00001118 \times r}}$$



## Trabajo experimental

A efecto de comparar el método tradicional de Loría y Monge (19), con las modificaciones aquí introducidas (CIHATA), realizamos mediciones de FeS y de CTF, utilizando el patrón de trabajo de Fe de 200 ug/dl y las columnas de adsorción para el método CIHATA. En el cuadro I se indican los valores obtenidos con 36 sueros normales, destacándose una excelente correlación de ambos métodos, sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). En el cuadro II los resultados se refieren a 14 muestras de sueros de mujeres a término de su embarazo, confirmándose de nuevo la buena correlación de los métodos.

CUADRO I

VALORES PROMEDIO PARA FeS  
Y CTF EN DONADORES DE BANCO DE SANGRE

(n = 36)

Método	FeS (ug/dl)		CTF FeS (ug/dl)	
	X	D.S.	X	D.S.
Loría y Monge (20)	123,8	35,3	357,5	41,9
CIHATA	127,1	36,3	356,6	45,8

FeS:  $r = 0,96$  ;  $p > 0,05$

CTF:  $r = 0,95$  ;  $p > 0,05$

CUADRO II

VALORES PROMEDIO PARA FeS y CTF  
EN MUJERES EMBARAZADAS

(n = 14)

	FeS (ug/dl)		CTFeS (ug/dl)	
	X	D.S.	X	D.S.
Loría y Monge (20)	103,0	38,3	483,5	60,4
CIHATA	112,8	38,0	481,8	72,4

FeS:  $r = 0,98$  ;  $p > 0,05$

CTF:  $r = 0,78$  ;  $p > 0,05$

### Comentarios finales (FeS y CTF):

- 1) Es definitivamente recomendable utilizar propipetas, pipetas automáticas, subterminales o serológicas debidamente calibradas, a efecto de que las alícuotas de suero, filtrados o reactivos sean exactas.
- 2) Antes de leer las cubetas, comprobar que no haya burbujas de aire adosadas a las paredes de las mismas, pues tienden a formarse a medida que se alarga la incubación entre el suero o filtrado y el tampón.
- 3) Las muestras con hemólisis apenas perceptibles son adecuadas para este método, dado que el Fe hemoglobínico no interfiere. Si la hemólisis es muy evidente, es preferible no utilizar estos especímenes. En todo caso, si el suero es fresco, deberán respetarse los tiempos de incubación exigibles en los procedimientos, pues el tampón ácido tiende a liberar Fe de la hemoglobina (19, 26, 31). Del todo debe descartarse sueros con hemólisis que han sido congelados para un ulterior análisis de la ferremia y de CTF (Sáenz G.F., observación personal) (16 mg de Hb/dl contienen aproximadamente 53,6 ug de Fe).

En la preparación del "pool" de sueros como control interno para FeS y CTF, se debe controlar la concentración de Hb (13, 15) la cual no debe ser mayor de 3 mg / dl (10 ug/dl de Fe hemoglobínico = 1.8 umol/L). En el caso de sueros normales, lipémicos o ictericos, los tiempos dados pueden prolongarse sin que se introduzca ningún error. No es necesario, con este método, hacer correcciones por bilirrubina o turbiedad (lípidos) dado que los cálculos para los cambios de absorbancia se basan en lecturas antes y después de la adición del reactivo de color, por lo que, de hecho, se realiza una corrección por cualquier absorción atribuible a esos factores.
- 4) Cuando se habla de agua libre de Fe, nos referimos a agua desionizada y luego /bidestilada. Puede usarse para estos efectos un sistema de demineralizador "Deeminac" o "Deeminizer" de la Crystal Research Laboratories. (Boston, Mass, USA). El agua libre de Fe puede sustituirse por solución salina comercial sin introducir errores (19). El ICSH (13) considera que el agua destilada en vidrio puede ser satisfactoria.
- 5) Todo el material de vidrio o plástico que se usa en ambos procedimientos debe estar libre de hierro. Nosotros utilizamos el sistema de lavado que recomienda el ICSH (14): el material de vidrio o de plástico —luego del lavado convencional—, se deja toda la noche en HCl de 2 umol/L. Luego se lava bien con agua destilada y se seca al calor el que sea de vidrio, y a temperatura ambiente el de plástico.
- 6) El  $MgCO_3$  que se ofrece en el comercio posee la fórmula aproximada  $3 MgCO_3 \cdot Mg(OH)_2 \cdot 3H_2O$ , pero difieren en sus propiedades físicas. Debe comprobarse su calidad adsorbente tal y como se indicó en la nota b. No se debe usar el  $MgCO_3$  que se recomienda para adsorción cromatográfica (14).
- 7) Con algunos lotes de  $MgCO_3$  no se han obtenido buenos resultados, al usarse como suero control o de referencia preparados comerciales liofilizados, que luego de reconstituidos son mantenidos a temperatura ambiente (14). El ICSH (14) recomienda la preparación de un pool de sueros que luego se congela en alícuotas a  $-40^\circ C$ . De esta manera se cuenta con un material excelente para el control interno con una estabilidad de al menos 18 meses. Puede también usarse suero de caballo (13). Nuestro pool de sueros normales lo preparamos así: 20 sueros obtenidos en condiciones asépticas se colocan en el refrigerador por 24-48 hrs. Al cabo de este período, se filtran a través de algodón y filtro estériles, añadiéndose por último 1 ml

de thimerosal al 1 por ciento como preservante para 80-120 ml del pool. La estabilidad en forma líquida es de varios meses, pero lo es mayor si se congelan alícuotas de unos 2 ml a  $-25^{\circ}\text{C}$ .

En estas condiciones, el último lote de sueros que preparamos fue estudiado por 34 semanas, con 29 análisis, dando el FeS  $97,45 \pm 7,6$  ug/dl ( $17,45 \pm 1,36$  umol/L) y la CTF  $311,5 \pm 5,9$  ug/dl ( $55,8 \pm 1,06$  umol/L). Como control comercial, nos ha dado excelente resultado tanto el Monitrol I como el II (Chemistry Control, Dade Co., Miami, Florida, USA), para los valores que se dan para la Casa DUPONT ACA, la cual utiliza métodos para FeS y CTF semejantes a los que aquí se relatan.

- 8) En relación a los reactivos, el ICSH es muy estricto en la selección de los mismos para su contenido en Fe (15). Los reactivos, por mejor que sea su pureza (AR), tienen trazas de hierro, que por lo general no interfieren en la medición. Para la comprobación del caso, debe confirmarse que la cubeta blanco de reactivos del método para FeS tenga una A baja (habitualmente bajo 0.010) al ser leída contra agua (19).
- 9) De acuerdo con el reporte del CSH (14), algunos sueros que se guardan por varios días pueden fallar para dar un supernatante claro en la prueba para CTF. Se recomienda en estos casos que la mezcla Fe + suero se caliente por 15 minutos a  $56^{\circ}\text{C}$ .
- 10) *Valores de referencia*

El FeS al nacimiento es de aproximadamente 200 ug/dl, con una caída rápida, a las pocas horas, hasta un promedio de 50 ug/dl, y luego se suscita un incremento que llega a los niveles de referencia del adulto, después de las tres primeras semanas de vida (\*). Nuestra experiencia con el método de Peters *et al.* (24) y con la modificación de Loría y Monge (19) nos permiten destacar que, al menos en nuestra población sana, el FeS en nombres oscila entre 60 y 170 ug/dl, y en mujeres entre 50 y 140 ug/dl. El método que aquí se preconiza, el cual no requiere precipitación de las proteínas, por lo general da de 10 a 20 ug/dl más alto que otros que si la prescriben, diferencia que viene dada por la pérdida de hierro en el precipitado protéico (32).

Los valores de referencia de CTF en adultos se pueden considerar entre 270 y 380 ug/dl, para métodos que, como el que aquí se preconiza, no requieren precipitación de proteínas.

- 11) Los valores de FeS y CTF debe obtenerlos cada laboratorio. A modo de mencionar algunos valores de referencia, citamos los de Noguera y Sáenz (23) para FeS con un método semejante al de referencia del ICSH (15):

hombres =  $121 \pm 28$  ug/dl  
mujeres =  $97 \pm 26$  ug/dl

Beale *et al.* (4), autores originales de varias de las ventajas analíticas con que en la actualidad contamos para la medición de la sideremia, reportan los siguientes valores normales en adultos:

---

\* En la vejez, los niveles de FeS decrecen a niveles entre 40 y 80 ug/dl (32).

hombres: FeS =  $116 \pm 29$  ug/dl (50-173)  
CTF =  $322 \pm 29,5$  ug/dl (264-380)  
IS =  $35,9 \pm 8,0\%$  (20,2-51,6)

mujeres FeS =  $107 \pm 31$  ug/dl (46-168)  
CTF =  $322 \pm 27,5$  ug/dl (268-376)  
IS =  $33,3 \pm 9\%$  (15,7-50,9)

Alvarado y Fernández (1) en 128 donadores de sangre, con los métodos modificados por Loría y Monge (19) refieren los siguientes hallazgos:

FeS =  $120 \pm 32$  ug/dl  
CTF =  $358 \pm 46$  ug/dl  
IS (%) =  $34 \pm 7\%$

por su parte Loría y Monge (19) citan los siguientes valores:

FeS =  $120 \pm 40$  ug/dl  
CTF =  $340 \pm 60$  ug/dl  
IS (%) =  $40 \pm 20$

Los autores, con respecto al IS  $\left(\frac{\text{FeS} \times 100}{\text{CTF}}\right)$ , hacen la siguiente clasificación:

- a) Un IS < de 10 por ciento indica deficiencia franca de Fe (anemia ferropriva).
- b) Un IS entre 10 y 15 por ciento, puede deberse a deficiencia de Fe, infección o carcinoma.
- c) Un IS entre 15 y 19 por ciento, generalmente señala infección o carcinoma.
- ch) Un IS entre 20 y 40 por ciento con FeS bajo, indica desnutrición severa.
- d) Un IS superior a 60 por ciento indica falta de utilización (eritropoyesis disminuida, o sobrecarga (hemosiderosis, hemocromatosis).

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se enumeran una serie de hechos analíticos en torno a la medición cuantitativa de FeS y de la CTF o transferrina funcional. A raíz de la introducción, por parte de Beale *et al.* (4) de una técnica directa —sin desproteinización— para FeS, de un reductor para el  $\text{Fe}^{+3}$  de fácil asequibilidad (ácido ascórbico) y de un cromógeno que, como la batofenantrolina, produce un compuesto con el  $\text{Fe}^{+2}$  de alta absorptividad molar, Loría y Monge (19) lograron introducir una serie de modificaciones que han convertido aquel método en un procedimiento rápido, sensible, reproducible y de bajo costo, aplicable tanto a la rutina como a la investigación. Nosotros nos hemos limitado a introducirle muy pocas variaciones, las cuales básicamente se refieren al uso de una mezcla de sueros normales para ser usada como control interno o material de referencia, a acortar el tiempo del método y a usar un solo patrón o estándar de Fe, tanto para el FeS como para la CTF. Asimismo, brindamos una serie de detalles técnicos de nuestra cosecha, como también de algunas recomendaciones que al respecto han emanado del ICSH (13, 14, 15).

El método para medir la CTF que aquí se preconiza, también ha sido el producto de la investigación que Loría y Monge (2) promovieron al modificar el método de adsorción con  $MgCO_3$  de Ramsay (25) ligado con el resto de la metodología de Beale *et al.* (4) para FeS y CTF. Con algunas variantes, este es el fundamento que preconiza también el ICSH (14). Nosotros hemos introducido algunos pocos cambios a la metodología de Loría y Monge (19), en especial con la preparación del patrón de Fe para saturar la T y en el proceso de adsorción con  $MgCO_3$  del Fe en exceso, al recomendar como alternativa, el uso de columnas descartables que se utilizan en los procedimientos de RIA, las cuales se empaquetan con unos 150 mg de  $MgCO_3$ , centrifugación posterior y obtención de un filtrado listo para cuantificarle el Fe ligado a la T. Asimismo, recomendamos el uso de un control interno de referencia para CTF con base en la aplicación de alícuotas de mezclas de suero normal mantenidas bajo congelación. Para esta determinación de la CTF también indicamos una serie de recomendaciones analíticas propias y del ICSH (14).

Al cabo de diez años de trabajar con las metodologías que aquí se preconizan, obra y fruto de Loría y Monge (19), nos place recomendarlas por la facilidad, rapidez de su ejecución y sensibilidad, en unión de una buena economía de suero, reactivos y materiales.

### ABSTRACT

*A methodology is proposed, for the determination of serum iron and functional transferrin, based on Beale's and on Ramsay's methods, substantially modified by Loría and Monge and which we have further modified, after a 10 year long experience.*

*For serum iron,  $Fe^{+3}$  is separated without deproteinization, using an acid glycine buffer, ascorbic acid as reducing agent and batophenanthroline as chromogen. For the functional transferrin,  $MgCO_3$  is used as  $Fe^{+3}$  absorbant, whose excess has saturated the transferrin. A series of technical and analytical details, product of the authors' experience, as well as the ICSH recommendations, are included.*

### BIBLIOGRAFIA

- 1.— Alvarado, M.A., Fernández, E. Determinación de protoporfirina eritrocítica unida a Zinc y otros valores hematológicos en donadores del Banco de Sangre del Hospital San Juan de Dios. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* 1983; 4: 1-6.
- 2.— Baiton, D.F.; Finch, C.A.: The diagnosis of iron deficiency anemia. *Am. J. Med.* 1964; 37: 62-66.
- 3.— Beale, R.N., Bostrom, J.O., Taylor, R.F. Improved rapid methods for the determination of iron content and binding capacity of serum. *J. Clin. Path.* 1962; 15: 156-160.
- 5.— Bothwell, T.H., Charlton, R.W., Motulsky, A.G. Idiopathic hemochromatosis. In. *The metabolic basis of inherited disease*. Fifth Ed. Mc Graw-Hill Book Co, 1983; Chap. 59, 1269-1298.
- 6.— Celada, A. Uvelli, D.; Huebers, H. Finch, C.A. In vitro kinetics of the double pool transferrin iron exchange. *Blood*, 1981; 58: 25-29.
- 7.— Celada, A., Busset, R., Gutiérrez, J., Martínez, J.L., Herreros, V. Estudio comparativo de la medida de la transferrina y de la capacidad total de fijación del hierro. *Sangre* 1981; 26: 1073-1082.
- 8.— Cook, J.D. An evaluation of adsorption methods for measurement of plasma iron-binding capacity. *J. Lab. Clin. Med.* 1970; 76: 497-506.

- 9.— Elizondo, J., Rojas, L.F., Ramón, M. Capacidad de fijación de la proteína transportadora de hierro, protoporfirina y embarazo. *Acta Bioq. Clin. Latinoam.* 1980; 14: 423-426.
- 10.— Grant, G.H., Kachmar, J.F. The proteins of body fluids. In: *Fundamentals of clinical chemistry* (Ed. N.W. Tietz), 2nd. Edit. W.B. Saunders, 1976; Chap. 7: 298-374.
- 11.— Huebers, H.; Bauer, W.; Huebers, E.; Csiba, E.; Finch, C.A.: The behaviour of transferrin in the rat. *Blood* 1981;57: 218-221.
- 12.— Huebers, H.; Josephson, B.; Huebers, E.; Csiba, E.; Finch, A.A. Uptake and release of iron from human transferrin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1981; 78: 2572-2776.
- 13.— ICSH. Proposed recommendations for measurement of serum iron in human blood. *Brit. J. Haemat.* 1978;38: 281-287.
- 14.— ICSH. The measurement of total and insaturated iron-binding capacity in serum *Brit. J. Haemat* 1978;38:281-287.
- 15.— ICSH. Recommendations for measurement of serum iron in human blood. *Brit. J. Haematol.* 1978; 38: 291-294.
- 16.— Jacobs, P.; Finch, C.A. Iron for erythropoiesis. *Blood* 1971; 37: 220-224.
- 17.— Jacobs, A. Disorders of iron metabolism. In *Recent advances in Haematology*, Churchill Livingstone London, 1982; 3: 1-23.
- 18.— Lewis, S.M. Aims and scape of standardization in haematology. *Haematología* 1982; 15: 17-37.
- 19.— Loría, A., Monge, B. Técnicas de dosificación séricas de hierro y de capacidad de fijación de hierro. *Rev. Inv. Clin.* (México) 1968; 20: 429-449.
- 20.— Lynch, S.R., Simon, M., Bothwell, T.H. Charlton, R.W. Circadian variation in plasma iron concentration an reticuloendothelial iron release in the rat. *Clin. Sci. Molec. Med.* 1973; 45: 331-334.
- 21.— Martinek, R.G. Review of methods for determining iron and iron-binding capacity in biological materials. *J. Am. Med. Technol.* 1970; 32: 582-589.
- 22.— Nannie, K.M., De Leeuw, L., Lowenstein, R. Hsieh, Y.S. Iron deficiency and hydremia in normal pregnancy. *Medicine* 1966; 45: 291-315.
- 23.— Noguera, J., Sáenz, G.F. Hierro sérico y capacidad libre de fijación al suero en adultos normales. *Rev. Med. Hosp. Nal. Niños* 1967; 2: 23-24.
- 24.— Peters, T.; T.J. Giovanniello; L. Apt., J.F. Ross. A simple improved method for determination of serum iron. *J. Lab. Clin. Med.* 1956; 48: 280-288.
- 25.— Ramsay, W.N. The determination of the total iron-binding capacity of serum. *Clin. Chim. Acta.* 1957; 2: 221-226.
- 26.— Ramsay, W.N. The determination of iron in blood plasma or serum. *Clin. Chim. Acta* 1957; 2: 214- 220.
- 27.— Rath, C.E., C.A. Finch. Chemical, clinical and immunological studies on the products of human plasma fractionation. XXXVIII. Serum iron transport. Measurement of iron-binding capacity of serum in man. *J. Clin. Invest.* 1948; 28: 79-85.
- 28.— Rocks, B.F., Sherwood, R.A. & Turner, Z.J. Serum iron and total iron-binding capacity determination by flow-injection analysis with atomic absorption detection. *Ann. Clin. Biochem.* 1983; 20: 72-76.
- 29.— Rybo, G. Causas fisiológicas de la ferropenia en la mujer: menstruación y embarazo. *In Clínica Hematológica* 1/2, Salvat, 1974; Cap. 3: 27-38.
- 30.— Schade, A.L. & Cafoline, L. An iron binding component in human blood plasma. *Science* 1964; 104: 340-341.
- 31.— Schales, O. Hierro en suero. In: Siligson, D.: *Métodos seleccionados de Análisis Clínicos*. Edit. Aguilar, Madrid, 1960; (IX) 95-107.
- 32.— Tietz, N.W. Blood gases and electrolytes. In: Tietz, N.W.: *Fundamentals of clinical chemistry*, 2nd. Edit. W.B. Saunders Co., Pha, 1976; Chap. 15: 923-929.
- 33.— White, J.M. & J. Flashka, H.A. An automated procedure with use of ferrozine for assay of serum iron and total iron-binding capacity. *Clin. Chem.* 1973; 19: 526-528.
- 34.— Woo, J., Treuting, J.J., Cannon, D.C. Metabolic intermediates and inorganic ions. In: Henry, J.B. *Clinical diagnosis and managment by laboratory methods* (Todd-Sanford-Davidsohn), 16nd. Edit., W.B. Saunders, Co., 1979; Chap. 10: 259-304.