



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**Escuela Nacional de Estudios Profesionales
Z A R A G O Z A**

**VARIACION DE LA CAPACIDAD TOTAL DE
FIJACION DE HIERRO SERICO CON RESPECTO
AL HIERRO SERICO EN PACIENTES
EMBARAZADAS.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ESTANISLAO PEREZ JUAREZ

México, D. F.

1 9 8 4





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

CAPITULO		PAG.
I	INTRODUCCION	1
II	FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	4
III	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
IV	OBJETIVOS.....	8
V	HIPOTESIS.....	9
VI	VI.A. MATERIAL HUMANO.....	10
	VI.B. MATERIAL PARA LA DETERMINACION DE HIERRO SERICO Y LA CAPACIDAD TOTAL DE FIJACION DE HIERRO SERICO.....	11
	VI.C. EQUIPO PARA LA DETERMI NACION DE HIERRO SERICO Y CAPACIDAD TOTAL DE FIJACION DE HIERRO SERICO.....	12
	VI.D. REACTIVOS PARA LA DETERMINACION DE HIERRO SERICO Y CAPACIDAD TO TAL DE FIJACION DE HIERRO SERICO	12
	VI.E. DETERMINACION DE HIERRO SERICO..	13
	VI.F. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD TOTAL DE FIJACION DE HIERRO SERICO	19
VII	DESARROLLO DEL TRABAJO	23
	VII.A. TOMA DE LA MUESTRA.....	24
	VII.B. TECNICA PARA LA DETERMINACION DE HIERRO SERICO.....	25
	VII.C. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD TOTAL DE FIJACION DE HIERRO	30
VIII	RESULTADOS.....	33
IX	DISCUSION.....	38
X	CONCLUSIONES.....	43
XI	APENDICES.....	45
XII	BIBLIOGRAFIA.....	49

I. INTRODUCCION

La función principal del hierro en el organismo humano se encuentra casi exclusivamente confinada a los procesos respiratorios de la célula, pero también este elemento tiene importancia fundamental por ser el componente esencial de la molécula de hemoglobina, del citocromo y de otros elementos de los sistemas enzimáticos respiratorios (1).

Las necesidades de hierro en la dieta humana varían grandemente en las diferentes edades y en diversas circunstancias aunque la mayoría del hierro es conservado en el cuerpo humano por reciclaje (2).

El promedio de pérdida de hierro en el hombre adulto sano es de aproximadamente 1 mg/día, en las mujeres adultas hay pérdida adicional de 0.5 mg/día (la cantidad de hierro en la sangre del flujo menstrual promediado durante un mes) (3).

Las cantidades diarias requeridas de hierro que recomiendan las autoridades de nutrición son:

Hombres: de 11 a 18 años: 18 mg

más de 19 años : 10 mg

Mujeres de 11 a 50 años y durante el

embarazo y la lactancia: 18 mg

Las mejores fuentes de hierro son: vísceras de animales, pescado, mariscos, verduras y leguminosas (4).

La mayoría del hierro de los alimentos se encuentra generalmente en estado férrico, cuando llega al estómago, actúan el ácido clorhídrico gástrico y los ácidos orgánicos; transformando el hierro en iones férricos y en hierro orgánico lábilmemente unido. En ésta forma el hierro es más soluble y debe, por tanto, ser más fácilmente absorbido.

La absorción de hierro se lleva a cabo principalmente, en el estómago, duodeno y principalmente en la parte alta del yeyuno (5,6).

La absorción por la célula epitelial gastrointestinal se adapta para admitir solo la cantidad necesaria de hierro que cubra las pérdidas, sin permitir ni un exceso ni una deficiencia de hierro en el cuerpo humano, esto lo logra por un mecanismo que esta controlado por una proteína (ferretina) (71).

El hierro liberado de las células epiteliales e intestinales que lo almacenan, es de nuevo reducido a la forma ferrosa (Fe^{2+}) y abandona el intestino para pasar al plasma (8).

El hierro del plasma en presencia de CO_2 , forma un complejo con una beta globulina que tiene afinidad por los metales, conocida con el nombre de transferrina o siderofilina y existe en la fracción, IV-7 de Cohn (9).

La transferrina puede fijar dos átomos de hierro por molécula para formar un complejo rojo de proteína ferrica (10).

De acuerdo a lo antes mencionado, la cantidad de hierro que el plasma puede fijar en un momento dado, está limitada por su contenido de transferrina, que por ello se denomina "Capacidad total de fijación de hierro" (11).

Una vía importante de recaptación de hierro es por desintegración de la hemoglobina de los globulos rojos (12).

La eliminación de hierro es muy limitada, por lo que el metabolismo puede considerarse como un ciclo cerrado, una vez que el hierro ha penetrado al organismo este no lo elimina.

La disminución en la cantidad de hierro normal del organismo se acompaña de anemia microcítica - hipocrómica en la que los globulos rojos son mas pequeños que los normales y contienen menos hemoglobina (13).

II FUNDAMENTACION DEL TEMA.

En el transcurso de la gestación existen mayores demandas de hierro sérico, debido a un aumento de la eritropoyesis materna y al crecimiento y función de la unidad feto-placenta (14).

La gestación plantea demandas no normales de hierro, para el desarrollo del feto, principalmente en el último trimestre de embarazo (15). El hierro requerido por el feto es transferido desde la sangre de la madre a través de la placenta por la proteína transferrina (16), siendo unidireccional de la madre al feto y tiene lugar merced a la existencia de un gradiente de concentración (17).

Durante el inicio del embarazo la futura madre, casi siempre, presenta escasos depósitos de hierro, por lo que es incapaz de aumentar el volumen eritrocitario, esto trae como consecuencia la presencia de anemia del tipo normocrómica-normocítica, pero si el déficit es grave se presentará el tipo de anemia hipocrómica microcítica que se caracteriza por una cifra baja de hierro circulante y por un aumento en la cantidad de proteína fijadora (transferrina) lo que se traduce en un aumento en la capacidad total de fijación de hierro (18).

Sin embargo, incluso en condiciones de ingreso adecuado de hierro durante el tercer trimestre se presenta una anemia del tipo normocítica-normocrómica que no responde a ningún tipo de tratamiento (20). Esto sucede en mujeres que comienzan su embarazo con reservas normales de hierro, pero es más notorio en aquellas mujeres que comienzan el embarazo con sus reservas disminuidas, por lo tanto no es sorprendente que estas demandas adicionales den origen a anemias ferropénicas (21).

Mediciones recientes de la masa de los glóbulos rojos han demostrado que la anemia del embarazo no es causada por la falta de hematies, sino mas bien por un aumento del plasma (22). Esta dilución del volumen eritrocitario provoca una disminución del hematocrito (23).

La hemoglobina alcanza en la mujer gestante un promedio de 11.0 g/100 ml (24).

No se sabe porque aumenta el volumen plasmático, aunque se supone que la aldosterona y otras hormonas esteroides y no esteroides así como la placenta actúan como una posible derivación arteriovenosa, lo cual provoca una hipervolemia (25).

En base a lo antes descrito, es de suma importancia que

durante el embarazo se conozca la variación que existe entre el hierro sérico y la capacidad total de fijación de hierro, para valorar la cantidad del hierro durante el embarazo y así poder controlar alguna anormalidad que se presente, para llevarlo a feliz termino.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido al riesgo que pueden correr la madre y el futuro bebe durante el embarazo por una deficiencia de hierro (anemia, retraso mental, insuficiencia respiratoria etc.), es de suma importancia conocer la variación entre el hierro sérico y la capacidad total de fijación de hierro sérico con el fin de detectar cualquier anomalía a tiempo y llevar a feliz termino la gestación.

IV. OBJETIVO:

DETERMINAR LA VARIACION EXISTENTE
ENTRE EL HIERRO SERICO Y LA
CAPACIDAD TOTAL DE FIJACION
DE HIERRO DURANTE EL EMBARAZO.

V. HIPOTESIS:

LA VARIACION EXISTENTE ENTRE EL
HIERRO SERICO Y LA CAPACIDAD TOTAL
DE FIJACION DE HIERRO SERICO DURANTE
EL EMBARAZO SE VERA AUMENTADA CONSIDERA
BLEMENTE DEBIDO AL CRECIMIENTO Y
FUNCION DE LA UNIDAD FETO PLACENTA.

VI. MATERIAL Y METODOS.

VI. A. MATERIAL HUMANO.

El material humano estuvo constituido por 186 mujeres embarazadas, entre la cuarta semana y la trigésima octava semana, de clase socioeconómica media, con un promedio de edad de 25.4 años, con límites de 16 años la menor y 40 años la mayor.

Ninguna de ellas presentaba antecedentes de donación de sangre en los dos años previos al embarazo, patología demostrada en sus embarazos anteriores, ni terapia con hierro durante el embarazo actual.

A todas las pacientes en ayunas, se les extrafo una muestra de 14 ml de sangre venosa, con un tubo al vacio sin anticoagulante.

VI. MATERIAL

VI. B. MATERIAL PARA LA DETERMINACION

DE HIERRO SERICO Y CAPACIDAD TOTAL

DE FIJACION DE HIERRO SERICO.

MATERIAL	MARCA
___ Tubos de ensayo de 15x125 mm	Pyrex
___ Pipetas volumétricas de 2 ml	"
___ Pipetas graduadas de 5 y 10 ml	"
___ Matraz Erlenmeyer de 250 ml y 500 ml	"
___ Gradillas metálicas para tubos de ensayo	"
___ Probeta Graduada de 1000 ml	"
___ Matraz aforado de 50, 100 y 1000 ml	"
___ Vasos de precipitado de 250 y 500 ml	"
___ Frascos ambar boca ancha de 500 ml	
___ Espátulas de diferente tamaños	
___ Tubos al vacio de 10 ml	Vacutainers, Blood lead determination amber Cat No 12300 American Can Co.
___ Papel parafilm	
___ Pipetas Pasteur	
___ Papel filtro	

VI. C. EQUIPO PARA LA DETERMINACION DE
 HIERRO SERICO Y CAPACIDAD TOTAL DE
 FIJACION DE HIERRO SERICO.

— Parrilla de Calentamiento	THERMOLYNE 7,200
— Balanza Granataria	METTLER PB 300
— Centrifuga	SOL- BAT 723
— Espectrofotómetro Junior II	COLEMAN INSTRUMENS
— Celdas de 2 cm de diámetro para el espectrofotómetro	COLEMAN INSTRUMENS
— Balanza analítica	METTLER H 80
— Agitador mecánico	THERMOLYNE 350

VI. D. REACTIVOS PARA LA DETERMINACION DE
 HIERRO SERICO Y CAPACIDAD TOTAL DE
 FIJACION DE HIERRO SERICO.

— 250 ml de ácido clorhídrico Q.P.	MERCK
— 500 g de ácido tricloroacético Q.P.	MERCK
— 100 g de 1.10-fenantrolina Q.P	MERCK
— 200 g de clorhidrato de hidroxilamina	MERCK
— 250 g de acetato de sodio Q.P.	MERCK
— 100g de cloruro férrico Q.P.	MERCK
— 500 g de carbonato de magnesio Q.P.	MERCK
— 250 ml de alcohol etílico Q.P.	MERCK

VI.E. DETERMINACION DE HIERRO SERICO.

En la determinación de hierro sérico por muy cuidadosa que sea la técnica utilizada para la obtención de la muestra, el suero o plasma humanos siempre contienen una pequeña cantidad de hemoglobina (29). Existen sin embargo, pruebas irrefutables de que el suero contiene más hierro del atribuible a la hemoglobina que hay presente en el mismo (30).

Como ya mencionamos anteriormente el hierro sérico está unido a la proteína transferrina, en forma de hierro funcional, por esta causa la mayoría de las técnicas para la determinación del hierro sérico involucra la ruptura del complejo hierro -proteína mediante la adición de un ácido (31).

Se ha demostrado que el Fe^{3+} es coprecipitado con las proteínas séricas por el ácido tricloroacético, en tanto que el Fe^{2+} no lo es (32). Es por ello esencial para lograr una total recuperación del hierro sérico asegurarse de que el hierro dissociado de la transferrina se reduzca a Fe^{2+} antes de la precipitación de las proteínas (33). Caraway incubó el suero con ácido ascórbico y ácido clorhídrico antes de la desproteinización.

del mismo con ácido tricloroacético y cloroformo (34).

Hay autores que han criticado el empleo tanto de ácido ascórbico como de ácido tioglicólico, basándose en el hecho de que en ciertas condiciones estos agentes reductores reducen el hierro de la hemoglobina dando lugar a valores falsos sumamente elevados (35). Estos autores proponen el empleo de otro agente reductor, la sal Nitroso-R, la cual no reduce el hierro hemoglobínico.

Se han propuesto métodos (36,37) en los cuales se separa el hierro de las proteínas mediante la adición del ácido, y se extrae el complejo férrico coloreado con alcohol isoamílico, evitando así la precipitación de las proteínas con la siguiente posibilidad de pérdida de hierro por coprecipitación. Estas técnicas plantean dificultades cuando se analizan sueros ictéricos porque la bilirrubina es extraída por el solvente orgánico y se oxida a biliverdina, la cual da graves errores positivos, a menos que se introduzcan las oportunas correcciones mediante blancos (38).

Una de las técnicas más satisfactorias parece ser la que utiliza la precipitación de las proteínas con ácido tricloroacético caliente (39), método que evita las pérdidas de hierro y da siempre soluciones ópticamente transparente para la fotometría (40). Los filtrados desproteínizados obtenidos con ácido tricloroacético contiene una significativa cantidad de absorción de fondo que puede corregirse haciendo las lecturas de la absorbancia antes del desarrollo del color (41).

En un procedimiento recientemente propuesto se libera el hierro de las proteínas mediante desplazamiento del mismo por la adición de torio tetravalente (42).

Entre los reactivos utilizados para la cuantificación espectrofotométrica del hierro citaremos los siguientes; tiocianato, 2,2-dipiridilo, 2,2,2,-tripiridilo, 1.10-fenantrolina y 4,7-difenil-1, 10-fentrolina (beta-fenantrolina) (43). Las absorptividades molares de los complejos fierro cromógeno oscilan desde 7000 para el tiocianato hasta 22140 para el disulfato de beta-fenantrolina (44). Los compuestos orgánicos que contienen el grupo ferrocina ($=N-C-C-N^+ =C$) que forman los complejos

coloreados con el Fe^{2+} , son los reactivos más sensibles para la determinación del hierro a nivel de trazas. Además de las fenantrolinas y los di o tripiridilos señalados anteriormente, se han utilizado los siguientes reactivos, todos los cuales contienen ferroína:

(a) 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), $\epsilon_{\lambda_{\text{max}}} = 22600$

(b) 2,6-di(piridil-2) 4-(p-metoxi fenil) piridina (DPIOP), $\epsilon_{\lambda_{\text{max}}} = 26900$; (c) 3-(2-piridil)-5, 6-bis (4-fenil sulfónico ácido)-1,2,4, - triazina (ferrozina) $\epsilon_{\lambda_{\text{max}}} = 27900$ (45).

Se han publicado métodos automatizados que utilizan reactivos derivados de la ferroína (46). Zack publicó un procedimiento en el que utilizaba beta fenantrolina.

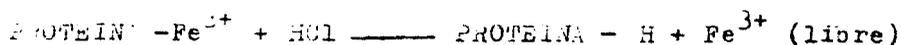
Encontró que el Fe^{2+} se analiza mejor y de forma más reproducible que el Fe^{3+} (47). En una modificación de esta técnica se recurre a un lavado con citrato entre muestra y muestra para reducir el ruido de fondo y el arrastre (48).

Aunque parecería lógico esperar que la absorción atómica se popularizaría rápidamente para la determinación de hierro en suero, no ha sido así (49). Se han publicado varios métodos, todos los cuales dicen haber obtenido buenos resultados, sin embargo se ha visto que la determinación

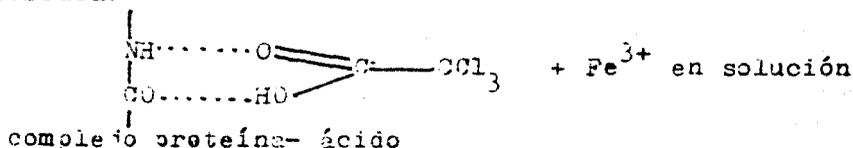
del hierro sérico a concentraciones bajas dada con esta técnica resultados de poca confiabilidad por limitaciones de sensibilidad, interferencia de las matrices e incapacidad de la absorción atómica para distinguir el hierro hemoglobínico del hierro de transporte (50).

De acuerdo a la información antes citada se escogió el método de Henry y Cols (34) modificando algunos pasos para evitar al máximo la pérdida de hierro que se encuentra en el suero. Dicho método tiene el siguiente fundamento: El hierro en el suero normal está ligado a la proteína transportadora de hierro en forma férrica.

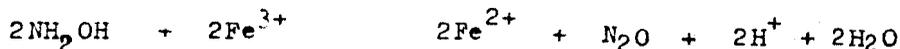
El ácido clorhídrico separa el hierro de la proteína.



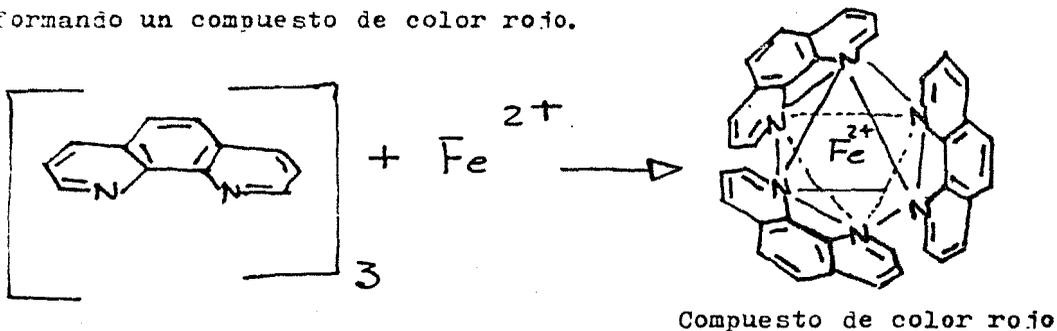
El ácido tricloroacético precipita las proteínas a 37°C (paso modificado) y deja en solución al hierro en forma férrica.



El clorhidrato de hidroxilamina se añade para reducir el hierro al estado ferroso (paso modificado).



La 1,10-fenantrolina reacciona con el hierro ferroso formando un compuesto de color rojo.



El acetato de sodio se añade para ajustar el pH a 3 a fin de permitir el máximo desarrollo de color.

La precisión del método es de aproximadamente $\pm 5\%$ con límites del 95%.

VI. F. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD TOTAL DE FIJACION DE HIERRO SERICO.

Holmberg y Laurell (51) observaron en 1945, que la adición de Fe^{2+} al suero daba lugar a la aparición de un color rojo. Al año siguiente Schade y Carolina (52) confirmaron este fenómeno, dándose cuenta de que se debía a la combinación del hierro con una proteína situada en la fracción IV-3,4 de Cohn. A la proteína que anteriormente había sido aislada y cristalizada (53), se le dieron los nombres de siderofilina, transferrina, y globulina beta-1 captadora del metal. Su concentración en los sueros normales es de aproximadamente, 0.21-0.36 g/100 ml (54).

El hierro en el complejo está en estado férrico, siendo el enlace más bien iónico que covalente (55). La combinación se produce cuando el pH es de 6.5 o superior y 1 mg de proteína se combina con aproximadamente 1.25 mg de hierro (56).

El color formado cuando la sustancia que se combina es el Fe^{3+} se ha descrito como rosa salmón, con un máximo de absorción a 400-465 nm (57). Cuando se agrega a la proteína Fe^{2+} , es necesaria la presencia de O_2 para que se desarrolle el color rosa salmón lo cual indica una alta oxidación al estado férrico (58).

La concentración de transferrina en suero puede determinarse directamente mediante técnicas inmunoquímica que son muy utilizadas. Otro procedimiento utilizado hoy en día, consiste en determinar la concentración de la proteína en terminos del contenido en hierro del suero después de su saturación. Cuando toda la transferrina presente se satura con hierro, la concentración de hierro en suero recibe el nombre de capacidad de captación de hierro o capacidad total de fijación de hierro (59). Normalmente solo una porción de la transferrina sérica se combina con el hierro, denominándose a la diferencia entre el hierro sérico y la capacidad total de fijación de hierro, con el nombre de capacidad de captación de hierro no saturada, también llamada capacidad latente de captación de hierro (60,61).

Se han propuesto varios procedimientos para la determinación de la capacidad total de fijación de hierro sérico, entre los que tenemos:

a). La técnica introducida por Schade y Carolina (62), en la que se agrega un exceso de hierro al suero y se determina el incremento del color rojo salmón. Esta técnica mide directamente la capacidad de captación no saturada.

b). En el método propuesto por Peters y Cols (63).

Se agrega fierro en exceso y se determina directamente el hierro no conjugado con dipiridilo, tripiridilo, beta fenantrolina o ferrozina. En una modificación de este método, que se efectúa en un solo tubo, se emplea el reactivo 2,4, 6-tripiril-triazina a pH 2.2 para medir el hierro sérico y el cromógeno tripiridilo a pH 9 para medir el exceso de fierro (64).

c). Se agrega un exceso de fierro y se precipita la transferrina con una mezcla de alcohol-éter, la cual sirve también como reactivo de lavado para eliminar el exceso de fierro libre; se separa entonces el hierro conjugado del precipitado mediante ácido tricloroacético y se determina espectrofotométricamente (65).

Diversos autores han comparado los méritos relativos de la absorción con resina y la absorción con carbonato de magnesio, utilizando tanto medidas espectrofotométricas como radioisotópicas (66).

Ramsay (67) propuso inicialmente una proporción de 100 mg de carbonato de magnesio por cada 5 microgramos de Fe^{3+} agregado y aconseja comprobar cada lote de carbonato de magnesio con respecto a sus propiedades absorbivas, las cuales varían de un lote a otro.

Uno de los autores citados anteriormente (68), agrega 5

microgramos de Fe^{3+} y utiliza 400 mg de carbonato de magnesio.

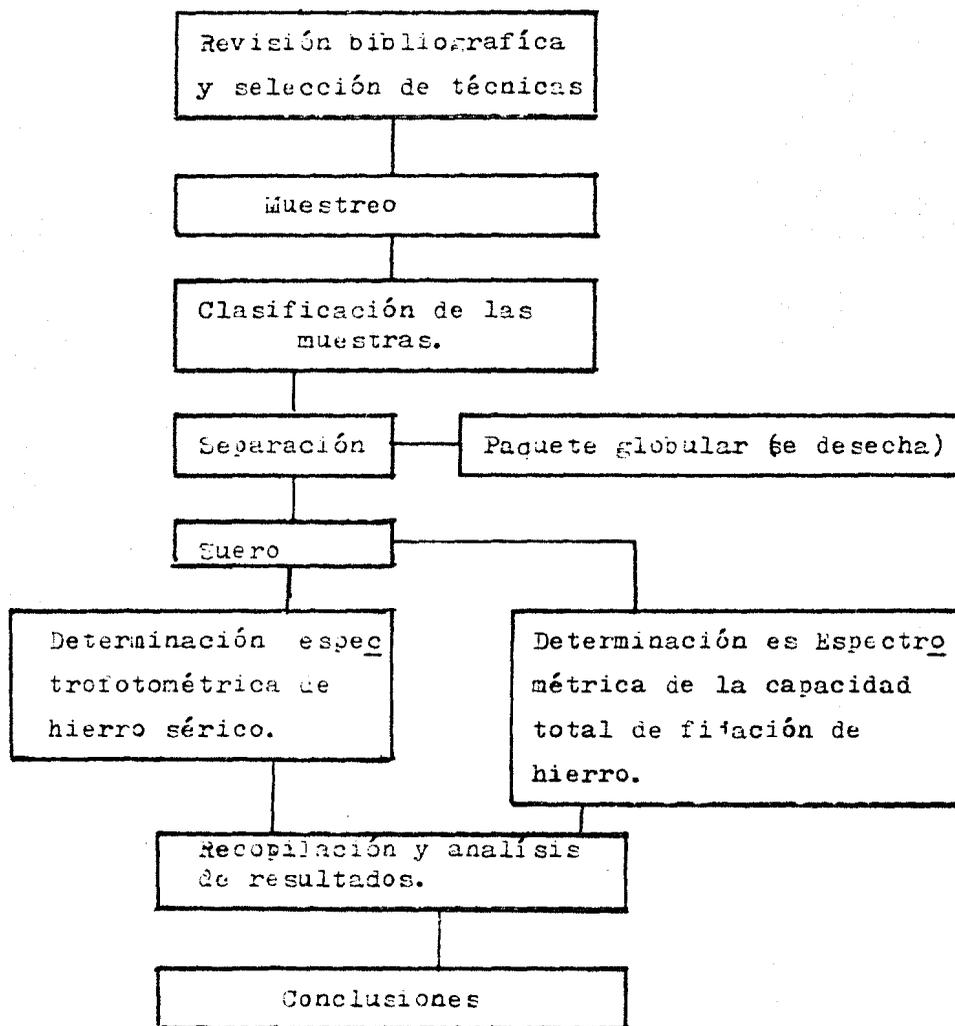
Se han publicado datos que justifican el empleo de carbonato de magnesio como absorbente, comparandolo con los métodos de referencia habituales y con los valores obtenidos en relación a la clínica (69).

Para la determinación de la capacidad total de fijación de hierro sérico, se seleccionó el método de Peters y Cols(39) en el que se satura la proteína ligadora de hierro con el cloruro férrico, el exceso de cloruro férrico se absorbe con carbonato de magnesio, precipitandose, dejando en solución a la proteína saturada. El clorhidrato de hidroxilamina se adiciona para reducir el hierro al estado ferroso. La fenantrolina reacciona con el hierro ferroso formando un compuesto de color rojo. El acétato de sodio se adiciona para ajustar el pH a 3 para permitir el máximo desarrollo de color.

El método es reproducible en $\pm 8.3\%$ (± 2 C.V.).

VII. DESARROLLO DEL TRABAJO

El trabajo se realizó de acuerdo al siguiente diagrama:



VII. A. TOMA DE LA MUESTRA.

a). Recolección. La sangre para la determinación de hierro sérico y de la capacidad total de fijación de hierro debe tomarse del paciente en ayunas hacia las 8.00 horas de la mañana.

La manera más conveniente de tomar la sangre y evitar la contaminación con fierro extraño es mediante el uso de tubos al vacío.

Las jeringas de cristal pueden usarse si han sido previamente lavadas con agua desionizada y esterilizadas.

b). Separación. Se deja coagular la sangre a temperatura ambiente, se separa el coágulo con una varilla de cristal bien limpia, se centrifuga el tubo a 3500 r.p.m. durante 15 minutos. Se decanta cuidadosamente el suero a un tubo de ensayo limpio.

c). Conservación. El suero se conserva en el refrigerador a la temperatura de 5°C hasta por una semana tapado con papel parafilm.

VII. B. TECNICA PARA LA DETERMINACION DE

HIERRO SERICO METODO DE HENRY Y COLE (34).

a). CURVA ESTANDAR

1. Solución estándar concentrada de fierro:

1.a. Pesar 200.2 mg de alambre de hierro de grado analítico en una balanza analítica y traspasar el fierro a un matraz aforado de 1000 ml.

1.b. Añadir al matraz 4 ml de ácido clorhídrico concentrado y 4 ml de agua desionizada y unas gotas de ácido nítrico concentrado al matraz, dejándose disolver el fierro.

1.c. Llevar el contenido del matraz a 1000 ml con agua desionizada.

Está solución contiene 200 microgramos de fierro/ml y es estable indefinidamente si se evita la evaporación.

2. Solución estándar de trabajo de fierro.

2.a. Traspasar 10 ml de la solución estándar concentrada de un trabajo a un matraz aforado de 1000 ml, diluir a la marca con agua desionizada y mezclar.

Está solución contiene 2 microgramos de Fe/ml aproximadamente en ácido clorhídrico 0.0005 N.

3. Curva estándar de fierro.

3.a. Pipetear 0.25 ml de la solución estándar de trabajo a un tubo de ensayo marcado con el número 1, en un segundo tubo marcado con el número 2 colocar 0.5 ml de la solución estándar, en un tercer tubo con el número 3 pipetear 0.75 ml de la solución de trabajo, en otro tubo con el número 4 pipetear 1.0 ml de la solución de trabajo, a otro con el número 5 pipetear 1.5 ml de la solución de trabajo, y al último tubo con el número 6 pipetear 2 ml de la solución de trabajo.

Las concentraciones de cada tubo se encuentran en la tabla 1.

Se agrega 1.75 ml de la solución de ácido clorhídrico (0.0005 N) al primer frasco, 1.5 ml al segundo, 1.25 ml al tercero, 1 ml al cuarto, 0.5 ml al quinto.

3.b. Añadir a cada tubo 0.5 ml de solución de hidroxilamina agitar y adicionar 0.5 ml de solución de fenantrolina, por último adicionar 2 ml de solución saturada de acétato de sodio, dejar reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y leer en un espectrofotómetro a 510 nm contra blanco de reactivos. Gráficar los resultados (apendice 1).

TABLA I CURVA ESTANDAR

TUBO	SOLUCION ESTANDAR	SOLUCION DE HCL	CONCENTRACION DE Fe^{3+} $\mu g/ml$
1	0.25 ml	1.75 ml	0.5
2	0.50 ml	1.5 ml	1.0
3	0.75 ml	1.25 ml	1.5
4	1.0 ml	1.0 ml	2.0
5	1.5 ml	0.5 ml	3.0
6	2.0 ml	-----	4.0

Técnica para la determinación de hierro sérico:

1. En un tubo de ensayo marcado con problema pipetear 2 ml de suero problema.
2. Adicionar al tubo problema 1 ml de ácido clorhídrico.
3. Reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Agitar vigorosamente.
5. Adicionar 1 ml de ácido tricloroacético al 20%.
6. Incubar a $37^{\circ}C$ por espacio de 30 minutos.
7. Agitar vigorosamente y centrifugar a 3,500 r.p.m. durante 10 minutos.
8. De la solución sobrenadante tomar 2 ml y colocarlos en otro tubo de ensayo marcado con el número 1.
9. En un tubo marcado con el número 2 colocar 2 ml de agua destilada (blanco).
10. En otro tubo marcado con el número 3 colocar 2 ml, de solución patrón de hierro (solución estándar de trabajo).

11. Agregar a los tres tubos 0.5 ml de solución de hidroxilamina.
12. Adicionar a los tres tubos 0.5 ml de solución de fenantrolina.
13. Adicionar a los tres tubos 2 ml de solución saturada de acétato de sodio.
14. Reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente, evitando el contacto con la luz.
15. Leer en un espectrofotómetro a 510 nm contra blanco de reactivos (tubo # 2).
16. Calcular la concentración de hierro sérico utilizando la curva estándar.
17. Los valores normales para el hierro sérico son:
mujeres 40 a 170 $\mu\text{g}/100$ ml.

Nota: Ver metodología simplificada en el cuadro # 2.

TABLA 2

METODOLOGIA SIMPLIFICADA DE LA DETERMINACION DE HIERRO
SERICO.

REACTIVOS	BLANCO	PROBLEMA	PATRON
SUERO	-----	2 ml	-----
AGUA DESTILADA	2 ml	-----	-----
HCl 2 N.	1 ml	1 ml	-----
REPOSAR	30 MIN.		
ACIDO TRICLOROACETICO 20%	1 ml	1 ml	-----
INCUBAR	330 MINUTOS A TEMPERATURA AMBIENTE DE 30°C.		
AGITAR VIGOROSAMENTE			
CENTRIFUGAR A	3.500 r.p.m.	10 MINUTOS.	
SOL. SOBRENADANTE	1 ml	1 ml	-----
SOL. ESTANDAR DE HIERRO	---	-----	1 ml
SOL. CLORURO DE HIDROXILAMINA	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
FENATROLINA	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
SOL. SATURADA DE ACETATO DE SODIO	2 ml	2 ml	2 ml
REPOSAR DURANTE	30 MINUTOS		
LEER %T	A 510 nm VS	BLANCO DE AGUA.	

VII. C. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD TOTAL DE FIJACION DE HIERRO. METODO DE PETERS Y COLS (39).

a) Curva Estándar:

Para la determinación de la capacidad total de fijación de hierro (C.T.F.H.S.) se utiliza la misma curva estándar que se trazo para hierro sérico excepto que el resultado se multiplica por 3.5 debido a que los 2 ml de suero utilizados se diluyeron a 7 ml.

Técnicas:

1. Marcar un tubo de ensayo con problema y un segundo tubo con blanco.
2. Al tubo problema adicionar 2 ml de suero problema.
3. Al tubo blanco adicionar 2 ml de agua desionizada.
4. A ambos tubos adicionar 5 ml de solución de cloruro férrico.
5. Dejar reposar ambos tubos por espacio de 15 minutos.
6. Adicionar a ambos tubos 400 mg de carbonato de magnesio.
7. Agitar ambos tubos en un agitador magnético por espacio de 30 minutos.
8. Centrifugar ambos tubos a 3,500 r.p.m. durante 15 minutos.

9. De la solución sobrenadante del problema traspasar 2 ml a un tubo limpio marcado con problema.

10. Del mismo modo llevar a cabo con el tubo blanco traspasando 2 ml de la solución sobrenadante a otro tubo limpio y marcado con blanco.

11. Adicionar a ambos tubos (blanco y problema) 0.5 ml de solución hidroxilamina (ver apéndice # 3).

12. Adicionar ambos tubos 0.5 ml de solución de fenantrolina.

13. Adicionar a ambos tubos 2 ml de solución saturada de acétato sodico.

14. Agitar y dejar reposar por espacio de 30 minutos, a temperatura ambiente, evitando el contacto con la luz.

15. Leer en un espectrofotómetro a 510 nm contra blanco de reactivos.

16. El cálculo se realiza en base a la curva estándar trazada para hierro sérico, excepto que el resultado se multiplica por 3.5 para tomar en cuenta la dilución

Los valores normales son:

Mujeres = 240 μg /100 ml.

Nota: Ver tabla 3 (metodología simplificada).

TABLA 3

METODOLOGIA SIMPLIFICADA DE LA DETERMINACION DE LA CAPACIDAD TOTAL DE FIJACION DE HIERRO SERICO.

REACTIVOS	BLANCO	PROBLEMA	PATRON
SUERO	----	2 ml	----
AGUA DESIONIZADA	2 ml	----	----
SOL. CLORURO FERRICO	2 ml	2 ml	2 ml
REPOSAR POR ESPACIO DE 15 MINUTOS			
CARBONATO DE MAGNESIO	400 mg	400 mg	400 mg
AGITAR DURANTE 30 MINUTOS.			
CENTRIFUGAR A 3,500 r.p.m. 10 MINUTOS			
SOL. SOBRENADANTE	1 ml	1 ml	----
SOL. ESTANDAR	----	----	1 ml
SOL. FENANTROLINA	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
SOL CLORURO DE HIDROXILAMINA	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
SOL. SATURADA DE ACETATO DE SODIO	2 ml	2 ml	2 ml
REPOSAR DURANTE 30 MINUTOS.			
LEER A 510 nm VS BLANCO DE REACTIVOS.			

VIII. RESULTADOS

El promedio de edad de pacientes embarazadas que se estudiaron fue de 25.4 años con límites de 16 años la menor y 40 años la mayor, de las cuales 57 fueron primigestas, en la tabla número 4 se indica la distribución según el número de embarazos previos de las 87 pacientes restantes.

TABLA 4
DISTRIBUCION SEGUN EL NUMERO DE EMBARAZOS PREVIOS.

EMBARAZOS	# DE CASOS
2	47
3	30
4	10
TOTAL	<u>87</u>

El 90% de pacientes pertenecían a la clase media, sin antecedentes previos al embarazo de anemia ferropénica, toxemias, abortos, multiparas (máximo 4 embarazos) y otras patologías en partos anteriores.

El tiempo mínimo de embarazo al momento de selección fue de una semana máximo de 38 semanas, con un promedio de 15.4 = \pm 1.7 semanas de embarazo.

En lo que se refiere a su alimentación un 60% tenía una dieta balanceada (carne, huevos, verduras etc.), como lo indica la tabla número 5.

TABLA 5
 DIETA QUE LLEVARON LAS PACIENTES EMBARAZADAS QUE SE
 ESTUDIARON.

	DIARIO	TRES VECES POR SEMANA	UNA VEZ POR SEMANA
CARNE	38 %	50 %	12 %
HUEVO	40 %	40 %	20 %
LECHE	28 %	60 %	12 %
VERDURAS	70 %	15 %	15 %
VISCERAS	60 %	20 %	20 %

Los resultados de la cuantificación de la hemoglobina de toda la muestra, presenta una distribución normal, con una media de 11.08 g/100 ml.

Según el criterio de la organización mundial de la salud, se considera anemia, cuando los valores de hemoglobina son menores de 11.0 g/100 ml (22).

La frecuencia de anemia en nuestro estudio fue del 47.9% correspondiente a 69 embarazos (tabla 6).

TABLA 6
 PORCENTAJE DE ANEMIA QUE PRESENTARON LAS PACIENTES EMBARAZADAS.

	CASOS	POR CIENTO	\bar{X} HEMOGLOBINA
CON ANEMIA	69	47.9 %	11.2 g/100 ml
SIN ANEMIA	75	52.1 %	11.8 g/100 ml

El valor promediado de hemoglobina en este grupo de gestantes anémicas fue de 10.2 g/100 ml y el de las 75 embarazadas restantes sin anemia fue de 11.08 g/100 ml.

El hierro sérico se cuantifica por el método de Henry y Cols modificado (68), aplicado a las muestras de suero obtenidos de las pacientes desde los inicios del embarazo (4 semanas) hasta el termino de este (38 semanas).

En la figura 1 se presenta la variación de hierro sérico durante el embarazo. Los resultados obtenidos (apendice 2), presentan una distribución normal, con una media de 42.2 g/100 ml y una desviación estándar de 13.9.

De acuerdo a la metodología utilizada los valores normales de hierro sérico son: 40-70 mg/100 ml.

La capacidad total de fijación de hierro sérico se determino por el método de Peters y Cols modificado (39), los resultados obtenidos (apendice 3), presentan una distribución normal, con una media de 437.5 mg/100 ml y una desviación estándar de 91.2. En la figura 2 se presenta la variación de la capacidad total de fijación de hierro sérico durante el embarazo.

FIGURA I
VARIACION DE HIERRO SERICO
DURANTE EL EMBARAZO

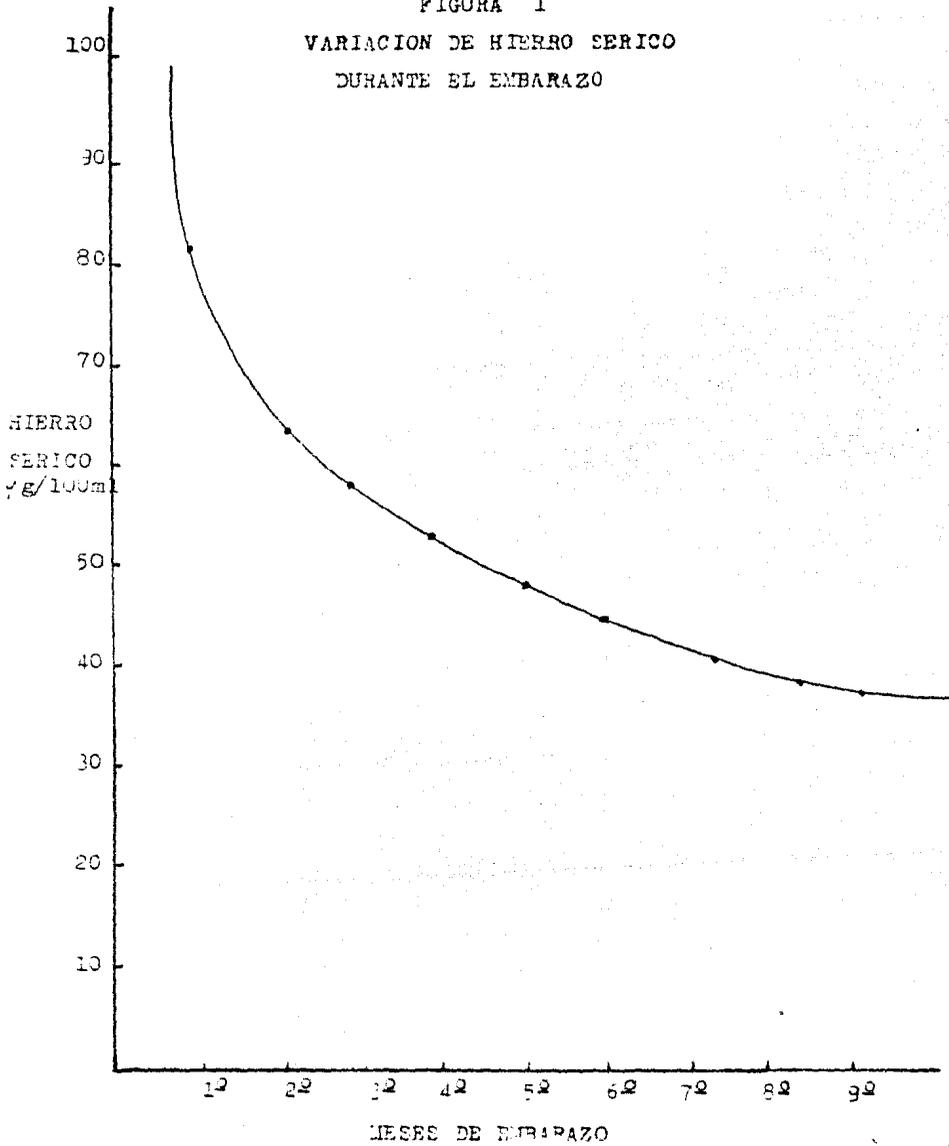
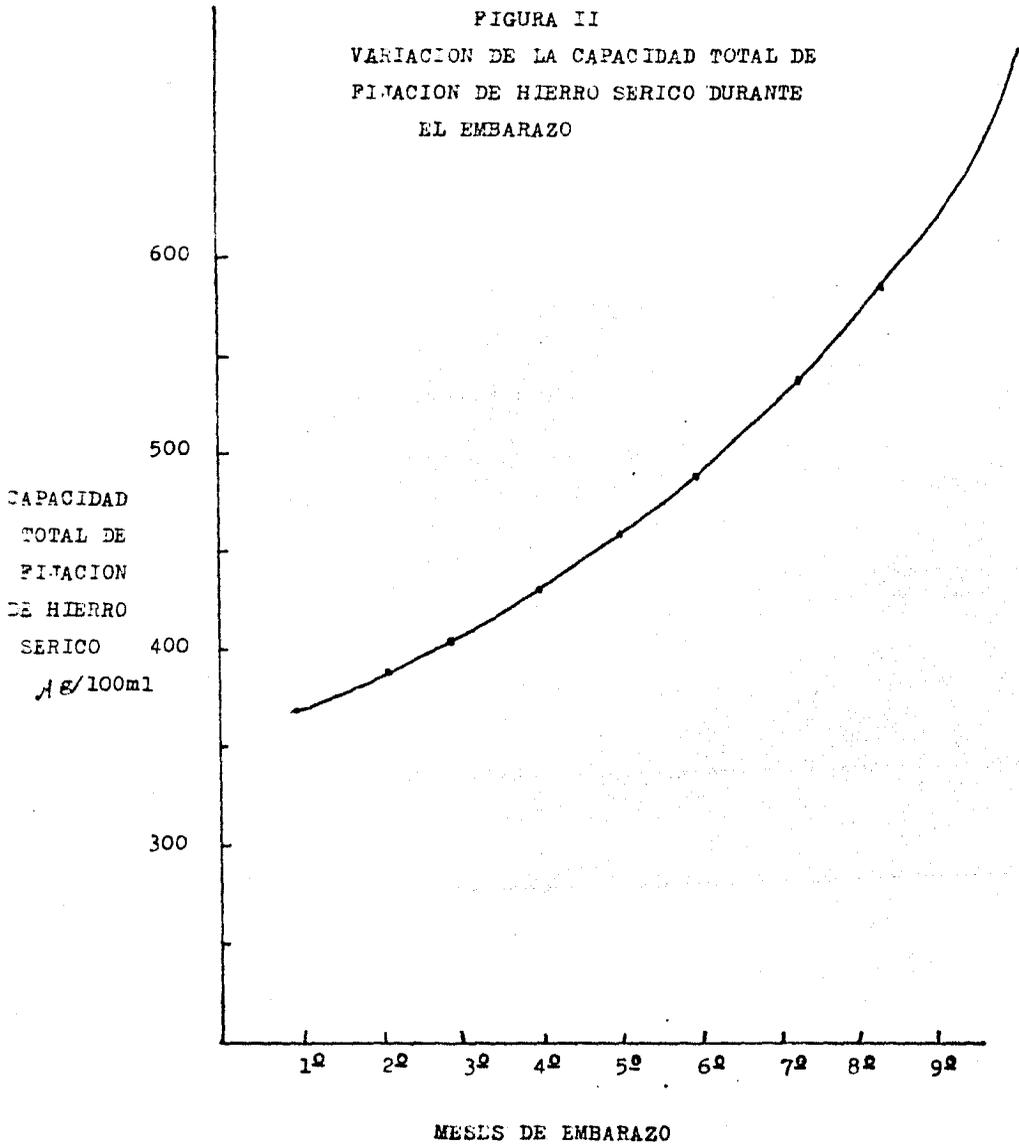


FIGURA II
VARIACION DE LA CAPACIDAD TOTAL DE
FIJACION DE HIERRO SERICO DURANTE
EL EMBARAZO



IX. DISCUSION

De los resultados obtenidos, se observa que el valor de hierro sérico decrece a medida que transcurre el embarazo (gráfica 1). Esto sucedió aun cuando las pacientes tenían una dieta balanceada de acuerdo a la encuesta realizada. Esto nos indica, que a medida que transcurre el embarazo, van en aumento las exigencias de hierro sérico por parte de la madre y el producto.

También se presentaron casos de anemia que se clasificaron de acuerdo a los criterios observados en la población de México (4), en anemias de primer grado.

TABLA 7

CRITERIOS PARA CLASIFICAR EL GRADO DE ANEMIA EN LA MUJER

ANEMIA	HEMOGLOBINA	HEMATOCRITO
GRADO I. REDUCCION DEL 20% EN LA HEMOGLOBINA Y HEMATOCRITO	13.5-10.8	41.33
GRADO II. REDUCCION DEL 20 AL 40% DE LA HEMOGLOBINA Y HEMATOCRITO	10.7-8.1	35-25
GRADO III. REDUCCION 50 y 60% DE HEMOGLOBINA Y HEMATOCRITO	8.0-5.4	24-16
GRADO IV. REDUCCION MAYOR AL 60% DE HEMOGLOBINA Y HEMATOCRITO	MENOR 5.4	MENOR 16

Aún considerando que durante el embarazo existe una hemodilución, que ocasiona una dilución de los glóbulos rojos que trae como consecuencia una anemia por dilución. Esto es de suma importancia mencionarlo ya que de alguna manera interviene en la cuantificación de hierro.

Para la cuantificación de la capacidad total de fijación de hierro sérico (C.T.F.H.S.) se tomaron en cuenta los mismos criterios.

Se observa que conforme avanza el embarazo, hay también un aumento de la proteína transferrina (figura 2).

Comparando las figuras 1 y 2 se observa que entre el octavo y noveno mes de embarazo son más significativos el aumento de la capacidad total de fijación de hierro sérico y la disminución del hierro sérico. Con esto se demuestra que en este periodo es cuando existe una deficiencia mayor de hierro en la mujer embarazada.

Para una mejor correlación e interpretación de los resultados obtenidos durante el desarrollo de la etapa experimental, debido a que se manejaron diversas variables, se procedió a hacer un análisis por discriminantes, el cual permite el manejo de datos experimentales que involucren diferentes variables. Para tal efecto se utiliza una computadora Bourroughs VGHS 7800 sistema MEP/DEVIC tomando como vectores las siguientes variables.

VARIABLES	VECTORES
Número de gestas	V_1
Edad	V_2
Hierro sérico	V_3
Capacidad total de fijación de hierro sérico.	V_4
Número de semanas de embarazo	V_5

Una vez hecho esto, se agruparon los vectores en matrices y se compararon las gestas en sus tres fases

Fase 1 = primer trimestre 1
 Fase 2 = segundo trimestre 2
 Fase 3 = tercer trimestre 3

Realizando las combinaciones de la siguiente manera:

V_{1-1} = primera gesta - Primer trimestre.
 V_{1-2} = primera gesta - segundotrimestre.
 V_{1-3} = primera gesta - tercer trimestre.

<u>V_{1-1}</u>	<u>V_{1-2}</u>	<u>V_{1-3}</u>
V_2	V_2	V_2
V_3	V_3	V_3
V_4	V_4	V_4
V_5	V_5	V_5

La computadora discriminó las diferentes variables hasta que determinó que el vector de hierro sérico era el más representativo pues el que tiene el valor mas bajo (V_{1-3} en V_3), principalmente en el tercer trimestre.

Esto lo gráfico la computadora en un mapa territorial de discriminantes (figura # 3) en donde el número uno representa el primer trimestre el número dos el segundo trimestre y el número tres representa el tercer trimestre. Es en este último trimestre en el que la disminución de hierro sérico es más significativa.

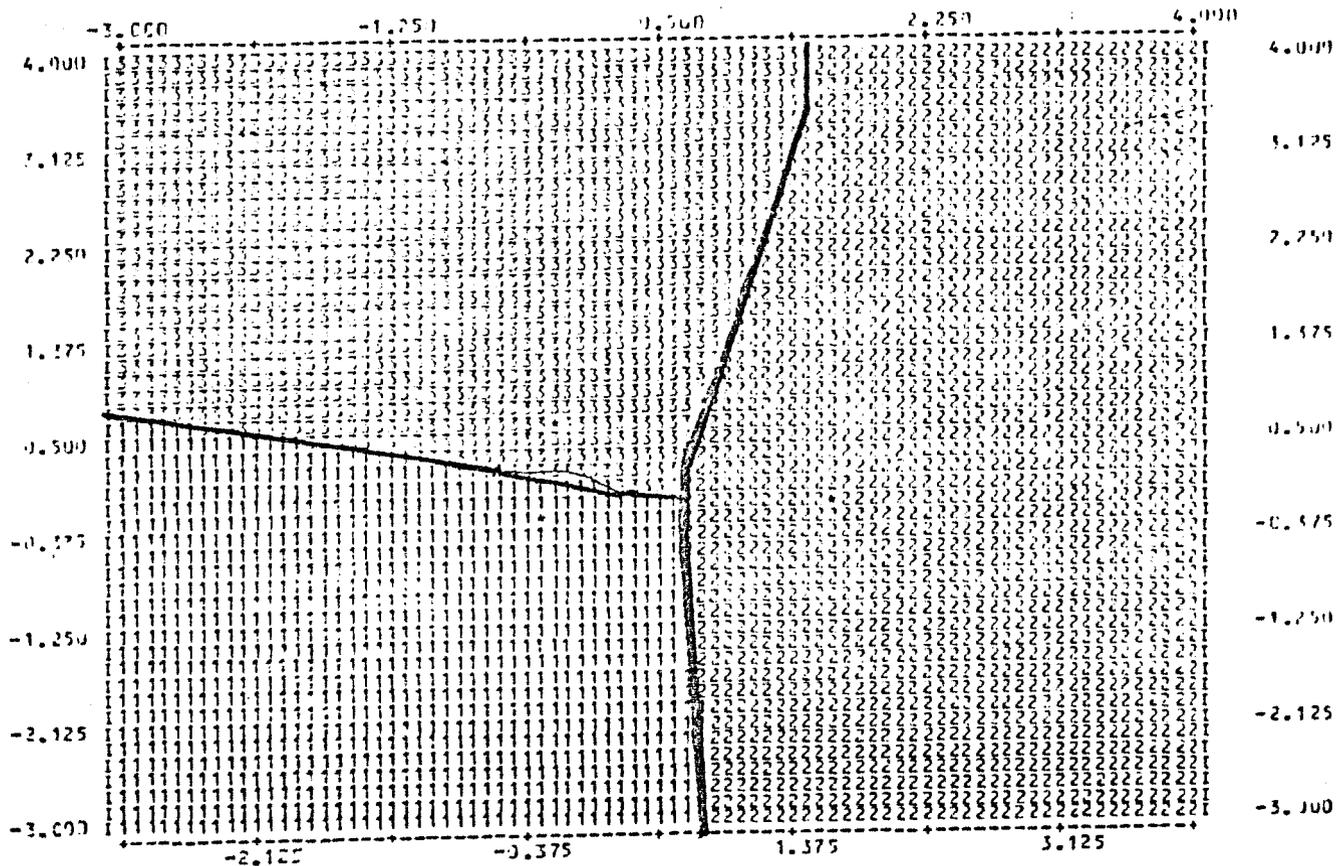
El porcentaje de variación de hierro sérico en cada trimestre es:

Primer trimestre = 15 % de disminución de hierro sérico.

Segundo trimestre = 23 % de disminución de hierro sérico.

Tercer trimestre = 62 % de disminución de hierro sérico.

ERRITORIAL MAP OF DISCRIMINANT SCORE 1 (HORIZONTAL) VS. DISCRIMINANT SCORE 2 (VERTICAL). * INDICATES A GROUP



X. CONCLUSIONES

En base a los estudios realizados, se llegó a las siguientes conclusiones.

1. Se comprobó la hipótesis de partida, pues se observa (figura 1 y 2) que mientras el hierro sérico disminuye conforme avanza el embarazo, la capacidad total de fijación de hierro sérico aumenta debido a que existe un aumento en la producción de la proteína transportadora (transferrina), y una disminución del hierro circulante, ya que el poco que existe se fija a la proteína y se utiliza al instante.

2. De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó que durante el embarazo existe una deficiencia de hierro conforme transcurre la gestación, que se debe principalmente al aumento de la eritropoyetina materna y al crecimiento y función de la unidad feto-placenta.

3. Se determinó que la deficiencia de hierro representa un estado intermedio de un proceso dinámico, al que procede el establecimiento del estado de anemia después de la utilización del hierro de depósito y del hierro circulante unido a la transferrina. De lo anterior se deduce un estado promotorio de la anemia, cuya oportuna identificación permitirá prevenir su desarrollo.

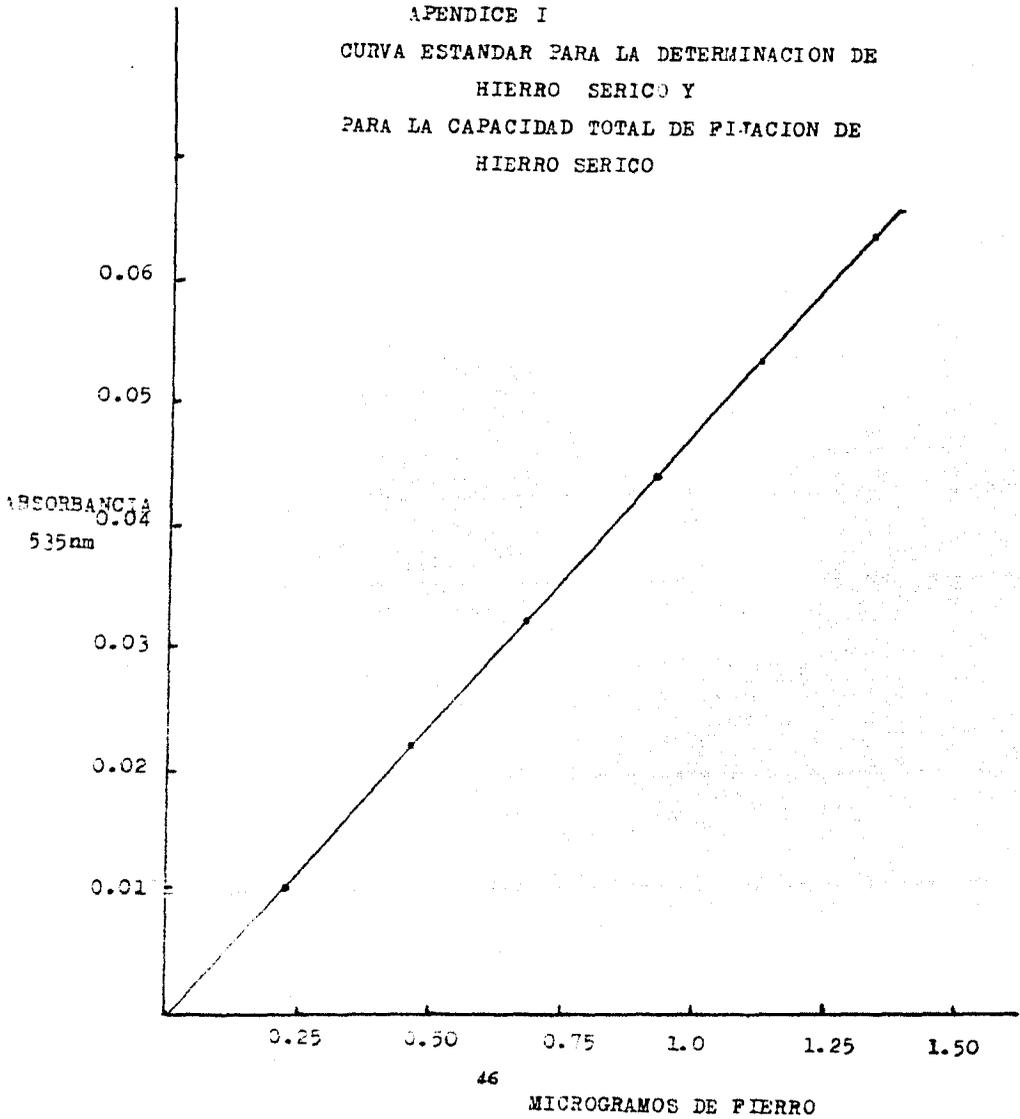
4. Se observó que la alimentación es la fuente principal para obtener este componente anti anémico.

Esta en nuestro medio no es equilibrada, ya que el aporte proteico de la dieta es muy bajo y su contenido de proteína de origen animal es mínimo.

5. Se observó que es durante el tercer trimestre cuando existe una mayor deficiencia de hierro, por lo que se sugiere que sea en este trimestre cuando se administre este hierro metálico por medio de una dieta balanceada o por tratamiento médico.

XI. APENDICES

APENDICE I
CURVA ESTANDAR PARA LA DETERMINACION DE
HIERRO SERICO Y
PARA LA CAPACIDAD TOTAL DE PIJACION DE
HIERRO SERICO



APENDICE II

PROMEDIO DE HIERRO SERICO DE ACUERDO AL MES DE EMBARAZO

MES DE EMBARAZO	PROMEDIO DE HIERRO SERICO µg/100ml	COEFICIENTE DE VARIACION
1	80.5	± 1.8%
2	60.5	5.1
3	55.3	3.6
4	50.0	2.7
5	45.1	2.3
6	42.7	2.2
7	40.6	1.8
8	37.7	2.0
9	30.7	2.2

APENDICE III

PROMEDIOS POR MES DE LA CAPACIDAD TOTAL DE FIJACION
DE HIERRO SERICO DE LAS PACIENTES.

MES DE EMBARAZO	PROMEDIO DE LA C. T. F. H. S. MG/100ml	COEFICIENTE DE VARIACION
1	368	+ 10.3
2	390	8.3
3	434	6.8
4	451	7.3
5	468	7.8
6	500	10.0
7	532	10.1
8	581	8.9
9	604	9.8

APENDICE IV

PREPARACION DE REACTIVOS

Acido clorhídrico 2 N. Colocar 163 ml de ácido clorhídrico concentrado en un matraz aforado de un litro, aforar con agua desionizada.

Acido tricloroacético al 20%. Colocar 200 g de ácido tricloroacético en un matraz aforado de un litro, aforar con agua desionizada.

Fenantrolina al 0.1%. Colocar 0.1 g de 1,10-fenantrolina en un matraz aforado de 100 ml aforar con metanol.

Solución saturada de acétato de sodio. Colocar 140 g de acétato de sodio en un vaso de precipitados de 250 ml, añadir 100 ml de agua desionizada y agitar la dilución.

Disolución de clorhidrato de hidroxilamina. Diluir 6.94 g de clorhidrato de hidroxilamina en 1000 ml de agua desionizada.

Disolución de cloruro férrico. Colocar 25 g de cloruro férrico en un matraz aforado de un litro, añadir 0.4 ml de ácido clorhídrico concentrado y aforar con agua desionizada.

Esta disolución contiene aproximadamente 5 mg de hierro por ml de ácido clorhídrico 0.0005 N.

XII. BIBLIOGRAFIA.

1. Erslev, Allan, J., Hematología, Aspectos Fisiopatológicos, Ed., Interamericana, México (1981).
2. Finch, C.A., Iron Metabolism. Nutrition Today, Summer, 1969, pág. 2
3. Jacobs, A., Iron balance and its disorders. Proc. Soc. Med. 63:1215, 1970.
4. Sherman, H.C., Chemistry of Food and nutrition, ed. The Macmillan Company, New York.
5. Harper, A., Harold., Manual de Química Fisiológica., Ed, Manual Moderno, México (1979).
6. Bothwell, T.H., and Finch, C.A., Iron Metabolism. Little, Brown, & Co., Boston, 1962.
7. Aisen, P., and Brown, E. B., Hte Iron Binding Function of transferrin in Iron Metabolism. Seminars Hematol. 14, 31, 1977.
8. Cnatarow, Abraham, Y Schepartz, Bernard., Bioquímica Ed. Interamericana, México (1979).
9. Granick, S., Structure and Physiological functions of ferretin, Physiol. Rev 31:489, 1951.
10. Sluke, D.D., Vam, Quantitative Clinical Chemistry, Vol. II: Methods. Ed. Williams & Wilkins, 1972. Reprinted 1976.
11. Rapaport, M.D. Samuel., Introducción al Hematología Ed. Salvat, México (1981).
12. Pape, L., Multani, J.S., Stitt, C., and Saltman, P., In vitro recostitution of ferretin. Biochemistry, 7:606, 1968.
13. Bainton, D.F., and Finch, C.A., The diagnosis of Iron deficiency anemia. Amer. J. Med. 37:62, 1964.

14. Báez, Flores, M; Chavéz, A; Trimer, C. y Lara, J. Ma.,
La anemia en el embarazo. Estudio de 600
embarazadas en la ciudad de Saltillo, Coah.
Salud Pub. México. 8:573, 1966.
15. Carr, M.C., The Diagnosis of Iron deficiency in
pregnancy. Obstet. Gynecol. 14:15 1974.
16. Williams, W. V., Hematology. Ed. Mc Grw-Hill Book
Co. New York, 1972. pag. 305
17. Benítez, de la Garza, T., Principios de Hemodinámica
en la mujer embarazada. En complicaciones
médicas durante el embarazo.
Sociedad Mexicana de Ginecología y Obstetricia
pag. 3-18, 1972.
18. Sánchez, Medel, L.; Labardini, J.L.; Pérez, V.M.A.,
y Loria., Anemia en el embarazo. I. Estudio
143 embarazadas de Huamantla Tlaxcala. Gac.
Med. Mex. 97: 1335, 1967.
19. Kaser, O., Friedberg, V., Ginecología y Obstetricia
Tomo II Embarazo y Parto.
Ed. Salvat, 2 da Edic., México (1980).
20. De Leeuw, NK., Lowenstein, L. and Hsieh, Y.,
Iron Deficiency and Hydremia in normal
Pregnancy. Medicine (Bah) 45; 291, 1966
21. Carr, MC., Obstet. & Gyn. 38;602. 1971.
22. Castelazo, A.L., Fisiología Materna durante el
el embarazo, en Obstetricia.
Ed. Francisco Méndes Oteo, México (1977).
23. Finch, A.C., y Monsen, R.E., JAMA 219 (11):1462-1465
1972.

24. Mcfee, John, G.; Anemia in pregnancy—Areappraisal
Obstet. Gynecol. Surv. 28:769, 1973.
25. Piliero, S.J., The interrelations of the endocrine
and erythropoietic systems in the rat
with special reference to the mecha-
nism of action estradiol and testosterone
Annals of the New York Academy of Science,
149:336-355 (1968).
26. Pritchard, J.A., Wiggins, K.M., & Dickey, J.C.,
Blood volume changes in pregnancy and
the the puerperium. I. Does seuque estration
of RBC 80:956-964 (1960).
27. Zubirán, S., Salud Pública de México. XI:500-508 (1969).
28. Barkan, G., y Walker, B.S., Detérmination of serum
Iron and pseudohemoglobin Iron with
o-phenanthroline.
J.Biol. Chem. 135: 37, 1940.
29. Vansotti, A., De la Chaux, A., Iron Metabolism and its
Clinical significance.
London, Muller, 1949.
30. Giorgio, A.J., Med. Clin. 54:1399, 1970.
31. Stojanovski-buban, A., Keler-Bacoka, M., Clin. Chim.
Acta., 25:478, 1969.
32. Ryall, R., Fielding, J., Clin. Chim. Acta, 28:193, 1970.
33. Ramsay, W.N.M., Bichem J., 53:227., 1953.
34. Caraway, W.T., Clin. Chim. 9:188, 1963.
35. Nessat, Dickerson, H.C., Clin Chim. Acta, 12:579, 1965.
36. Henry, R.J., Sobiel, C., Chiamori, N.,
Clin. Chim. Acta, 3:523, 1958.

37. Rosenthal, H.L., Pfluke M. L., Jud, L.,
Clin. Chem., 4:290, 1958.
38. Kingsley G.R., Gatchell G., Clin, Chem., 2:175, 1956.
39. Kaldor I., Austral J. exp. Biol., 31:41, 1953.
40. Trider P., Analyst, 85:880, 1960.
41. Trinder P., J. Clin. Path, 9:170, 1955
42. Hessler, L., Zak, B., Am. J. Clin. Pathol., 28:549. 1957.
43. Diehl H., Smith G.F., the Iron Reagents.
Edited by McBride L, Cryberg R.,
Columbus, Ohio, Fewswaixk Smith Chem. Co.
1965.
44. Fischer, D.S., Petrice, D.C., Clin, Chem. 10:21, 1964.
45. Carter B., Anal. Biochem., 40:450, 1971.
46. Kauppinnen, V., Grefc. G., Scand J. Clin, Lab. Invest.
29:38, 1967.
47. Zak B., Epstein L., Clin. Chem., 11:641, 1965.
48. Kayppinen V., Gref G.G., Scand J. Clin. Lab. Incest.
29:38, 1967.
49. Fernandez H. J. Kahn H.L., Clinical Chemitry Newsletter
Norwlak, Conn, Perkin-Elmer Corporation,
fall 1977, Vol. 3 No 2 .
50. Zettner A., Sylvia L. C., Camacho-Delgado I.,
Am. J. Clim, Pathol. 45:533, 1966.
51. Holberg C.G., Laurell C.B., Acta Physiol. Scand.
10:307, 1945.

52. Schade. L., Caroline L., Science, 104:240, 1946.
53. Koecilin B., J. Am. Chem. Soc., 74:2649. 1952.
54. Eckman I., Robins J.B., Vandenhamer C. J.A., Lentz J.,
Scheingerg I. H., Clin. Chem., 16:583, 1970.
55. Aasa R., Malmstom B.G., Saltman P., Vanngard T.,
Biochim. Biophys. Acta., 75:203, 1963.
56. Brizivuch B., J. Clin. Pathol., 21:183, 1968.
57. Schatz B.C., Determination of Protein-Bound and
Unbound Calcium in Serum usin Detran Gel
Graduate School Thesis, University of
Southern California, 1962.
58. Payne R.B., Levell M.M., Clin. Chem., 14:173, 1968.
59. Mendel E.E., Clin. Chem., 5:1, 1959.
60. Persi J.P., Vanderslik W., Riethorst A., Clin. Chem
Acta 35:91, 1971.
61. Williams H.L., Conrade M.E., J. Lab. Clin. Med. 67:171. 1966.
62. Fischer D.S., Perice D.G., Clin Pthol., 22:605, 1969.
63. Fischer D.S., Perice D.G., Clin. Chem., 10:21 1964.
64. Cook I.D., J. Lab. Clin. Med., 76:467. 1970.
65. Ramsay W.M.M., Clin, Acta., 2:321, 1960.
66. Joepke J.A., Am. J. Clin. Pathol., 44:77, 1965.
67. Lehmann H.P., Kaplan A., Clin, Chem., 17:941, 1971.
68. Henry R. I., Sobiel., Chiamory N., Clin. Chim. Acta,
3:523, 1960.
69. Zar B., Epsteine E., Clin. Chem. 11:641, 1965.