

2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

## BIBLIOTECA FAC. DE QUIMICA

COMPARACION DE METODOS PARA MEDIR LA  
CAPACIDAD DE FIJACION DE HIERRO DE LA  
TRANSFERRINA EN SUEROS FRESCOS Y EN  
SUEROS LIOFILIZADOS.

SUSTENTANTE: ALICIA LARA LEMUS  
CARRERA: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
ORIENTACION: BIOQUIMICO MICROBIOLOGO

1 9 7 7



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.

Tesis 1977  
DA ~~M-228~~ 229  
ECHA \_\_\_\_\_  
•ROC \_\_\_\_\_  
S \_\_\_\_\_



QUIMICA

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE:	JOSEFA PIEDRAS
V O C A L :	ROSA B. MARTINEZ
SECRETARIO:	GUADALUPE LETICIA CARRASCO
1er. SUPLENTE:	ESTHER GUTIERREZ
2do. SUPLENTE:	CLEMENTINA BALAUZARAN

Sitio donde se desarrolló el tema :

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION

Nombre del Sustentante: ALICIA LARA LEMUS

Nombre del Asesor: JOSEFA PIEDRAS

## CONTENIDO

1	OBJETIVOS
2	GENERALIDADES
3	MATERIAL Y METODOS
4	RESULTADOS
5	DISCUSION
6	CONCLUSIONES
7	BIBLIOGRAFIA

CAPITULO 1

OBJETIVOS

El objeto de este trabajo es determinar el efecto de la liofilización del suero en la capacidad de la transferrina de fijar hierro, motivado por las siguientes consideraciones: Las dosificaciones de hierro sérico y capacidad de fijación de hierro de la transferrina del suero humano son hechas en el laboratorio clínico para ayudar al diagnóstico diferencial de pacientes con anemia.

Junto con la creación del análisis químico con aplicación clínica surge un problema; el resultado de una medición es diferente para cada laboratorio que la practique, variando la magnitud de esta diferencia con la complejidad del método usado, la naturaleza del constituyente por determinar, la calidad del trabajo del laboratorio así como el material de que se disponga para trabajar.

La importancia de las dosificaciones de hierro y capacidad de fijación ha preocupado últimamente a la Organización Mundial de la Salud que ha intentado uniformar las cuantificaciones hechas en diferentes partes por medio de "Programas de Estandarización".

En la actualidad en el Instituto Nacional de la Nutrición se ha iniciado un Programa de Estandarización. Dicho programa consiste en enviar, periódicamente a diferentes laboratorios, equipos de trabajo conteniendo: sueros liofilizados, reactivos y protocolo de trabajo.

Desde 1949 Schade (5) encontró que el bicarbonato tenía participación en la unión del hierro a la transferrina. A partir de entonces varios investigadores (9, 10) han tratado de contestar la pregunta de si se requieren o no iones bicarbonato u otros aniones sinergistas (p.ej. ácido nitrilotriacético, citratos) para que el hierro se una específicamente a la transferrina.

Bates y colaboradores (20) usando apotransferrina pura en solución, a pH fisiológico, llegaron a la conclusión que para que se efectuara la unión de  $\text{Fe}^{3+}$  a los dos sitios específicos de la molécula de transferrina, se requería la presencia de bicarbonato u otros aniones sinergistas, y que en ausencia de estos se llevaba a cabo una unión no específica del  $\text{Fe}^{3+}$  a la transferrina.

Por otro lado Dorantes (21) encontró que el contenido de  $\text{CO}_2$  en plasmas liofilizados y reconstituídos con agua era prácticamente cero.



CAPITULO 2

GENERALIDADES



NANA = Acido-N-Acetil-neuramínico

GAL = Galactosa

GlcNAc = N-Acetilglucosamina

Man = Manosa

La secuencia de aminoácidos de la parte proteica de la transferrina sérica human no se conoce, no obstante se han hecho estudios para cuantificarlos (7):

Aminoácido	Mann y colaboradores (7) No. de residuos	Bezkorovainy y colaboradores (8) No. de residuos
Lis	51	58
His	19	16
Arg	24	24
Asp	81	74
Tre	30	26
Ser	40	35
Glu	58	55
Pro	30	28
Gli	54	46
Ala	59	53
Cis	35 (32)	32
Val	43	34
Met	4	8
Ile	14	14
Leu	57	56
Tir	24	23
Fen	28	26
Tri	9	7

La tabla anterior fué elaborada considerando el peso de carbohidratos de 6% y el peso molecular de 76,600.

En condiciones fisiológicas, la apotransferrina puede fijar átomos de hierro férrico en sitios específicos para unir metal, se une también una molécula de bicarbonato por cada átomo de

de hierro, formando un complejo color salmón que tiene un máximo de absorción de luz visible alrededor de 465 nm (9).

Las estructuras de los sitios de unión para metal de la transferrina, no se conocen con exactitud, pero se piensa que en la unión de los átomos de hierro están involucrados tres residuos de tirosina (10, 11) así como dos histidinas (12).

Fletcher y Huehns (13), han propuesto que los dos sitios de unión de hierro de la transferrina se comportan de diferente manera con respecto a la transferencia de hierro a los tejidos.

Un sitio designado "A", libera su hierro preferentemente a los eritroblastos, y el sitio "B" lo libera preferentemente a otros tejidos como el hígado.

Investigaciones posteriores hechas *in vitro* (14) e *in vivo* (15) apoyan ésta hipótesis.

El peso molecular para la transferrina sérica humana ha sido objeto de estudio de muchos investigadores que han propuesto valores desde 67 000 hasta 95 000, sin embargo, los trabajos más recientes informan un peso molecular cercano a 76 000 (7,16).

En condiciones normales la transferrina es sintetizada en el hígado, en el torrente sanguíneo su concentración varía de 0.24 a 0.28 g/dl (17) y solo la tercera parte del total de transferrina circulante está saturada con hierro.

Su función principal es transportar el hierro de los sitios de absorción (duodeno) ó almacenamiento (hígado, bazo y médula ósea) a los sitios de utilización para la biosíntesis de hemoglobina en las células eritroides.

Se han propuesto dos modelos para explicar la captación del hierro de la transferrina por el reticulocito. Jandl y colaboradores (18) piensan que la liberación del hierro se lleva a cabo a nivel de membrana. Otros como Morgan y colaboradores (19) tienen evidencia del paso de la transferrina dentro de la célula y piensan que la transferrina entra por pinocitosis y se une a la mitocondria para liberar el hierro.

CAPITULO 3

MATERIAL Y METODOS

En condiciones normales, las moléculas de transferrina del suero, pueden existir con 0, 1 ó 2 átomos de hierro. La proporción de los tres tipos de transferrina, con respecto a la saturación con hierro; corresponden a una distribución al azar de los átomos de hierro entre los dos sitios de unión de la proteína, ésto hace que la cantidad total de hierro unido corresponda aproximadamente a la tercera parte de la capacidad total de la transferrina para unir hierro, es decir está saturada en un 30%. A este valor se le llama índice de saturación de la transferrina.

En el laboratorio clínico, la transferrina se mide por métodos indirectos; adicionando al suero o plasma problema un exceso de  $Fe^{3+}$ , para saturar completamente la transferrina libre. Después de éste primer paso común, los métodos disponibles en la actualidad, se pueden dividir en dos grupos. En el primero de ellos, se adiciona directamente un cromógeno del hierro para cuantificar colorimétricamente el exceso de hierro no unido, y la capacidad libre de fijación (CLF), se calcula, restando al hierro total adicionado, el hierro que quedó libre. En el otro grupo de métodos, el exceso de hierro libre es eliminado por adsorción en un compuesto insoluble (p. ej. carbonato de magnesio, resina intercambiadora de iones o carbón recubierto con hemoglobina).

El hierro unido a la transferrina, que queda en el sobrenadante representa la capacidad total de fijación (CTF),

que es entonces cuantificada por espectrofotometría o por determinación radioisotópica (CLF).

En el presente trabajo se usaron dos métodos diferentes para cuantificar la capacidad de fijación de hierro: CLF por método colorimétrico (22) y CTF (23) usando como adsorbente carbonato de magnesio. Se dosificó además hierro para poder comparar CLF y CTF.

Para todas las cuantificaciones se usaron sueros de pacientes del Instituto Nacional de la Nutrición. En los experimentos en los que se trabajaron sueros antes y después de liofilizar, se hicieron mezclas de sueros con CLF similares, hasta tener un total de 6 ml; los cuales se dividieron en dos alícuotas de 3 ml, una de ellas fué liofilizada y la otra se usó para la dosificación en suero fresco. Todos los sueros se dosificaron por duplicado.

#### PREPARACION DE REACTIVOS BUFFER A CONCENTRADO

En vaso de precipitados de 50-100 ml, colocar 0.75 g de glicina y unos 30 ml de agua. Disolver y ajustar a pH  $1.9 \pm 0.02$  con HCl N. Aforar a 50 ml en matraz volumétrico. Guardar refrigerado.

#### BUFFER B CONCENTRADO

En un vaso de precipitados de 50-100 ml, colocar 1.21 g



de tris (hidroximetilaminometano) y 0.98 g de anhídrido maleico (o bien 1.16 g de ácido maleico). Disolver por agitación en unos 30 ml de agua. Ajustar a pH 8.5 con NaOH N. Al día siguiente, comprobar que el pH sea de 8.5. En caso afirmativo, aforar a 50 ml en matraz volumétrico. Guardar refrigerado.

#### BATOFENANTROLINA

Colocar 160 mg de batofenantrolina sulfonatada (la forma sulfonatada la surte Sigma y es soluble en agua) en matraz de 25 ml. Aforar con agua y disolver.

#### SOLUCION MADRE DE HIERRO

En un matraz volumétrico de 250 ml colocar 175.5 mg de sulfato ferroso amónico hexahidratado o 25 mg de alambre de hierro Q.P. Agregar 1.5 ml de ácido sulfúrico concentrado y aproximadamente 100 ml de agua, si se trata de alambre de hierro calentar hasta que se disuelva completamente. Pesar 15 mg de permanganato de potasio y disolverlos en 10 ml de agua desionizada. A continuación agregar el permanganato gota a gota a la solución de hierro hasta que la adición de una gota le confiera a la solución un ligero tinte rosado.

Aforar a 250 ml con agua. Esta solución es estable a temperatura ambiente y contiene 100 ug/ml de hierro.

## SOLUCIONES DE TRABAJO

### BUFFER A

La solución de trabajo se prepara agregando 1 ml de agua y 1 ml de buffer A concentrado.

### BUFFER B

La solución de trabajo se prepara agregando 1 ml de una solución de hierro de 6 ug/ml de ácido ascórbico al 0.5% a cada mililitro de buffer B concentrado.

### SOLUCION DE HIERRO DE 10 ug/ml :

Colocar 1 ml de la solución madre de hierro en un tubo de 15 X 125 mm y agregarle 9 ml de agua.

### SOLUCION DE HIERRO DE 6 ug/ml :

Colocar 6 ml de la solución madre de hierro en un matraz volumétrico de 100 ml y aforar a la marca con agua.

### NOTAS:

Material de vifriería.- Todo el material de vidrio usado en todas las técnicas debe estar libre de hierro. La cristalería quede libre de hierro colocándola toda la noche en ácido nítrico diluido con un volumen igual de agua libre de hierro. Al día siguiente se enjuaga 12 veces con agua destilada y tres veces con agua libre de hierro, y se seca al aire colocándola boca abajo sobre papel filtro limpio.

Agua libre de hierro.- Toda el agua utilizada en las cuatro técnicas debe estar libre de hierro, para ello debe pasarse por un sistema desmineralizador "Deeminac" ó "Deeminizek" de la Crystal Research Laboratories. Puede sustituirse por solución salina isotónica sin introducir errores.

#### TECNICA DE HIERRO SERICO (22)

En dos celdillas de 12 X 75 marcadas 1 y 2, colocar 0.5 ml de agua en el tubo 1 y 0.5 ml de suero problema en el tubo 2.

A ambos tubos añadir 1.5 ml de buffer-A recién preparado según las instrucciones citadas en la parte de preparación de reactivos. Mezclar y dejar reposar 30 minutos. Leer la densidad óptica (DO) del tubo 2 llevando a cero de densidad óptica con el tubo 1 (ésta es la DO-1 del tubo 2), Las lecturas se hacen a 530 mm de longitud de onda en espectrofotómetro Coleman Jr.

Añadir 0.03 ml de batofenantrolina a ambos tubos y mezclar inmediatamente. A los 40-60 minutos, leer nuevamente la DO del tubo 2 contra el tubo 1 (DO 2) del tubo 2). La diferencia DO-2 menos DO-1 es convertida a ug de hierro/dl de la curva de calibración.

#### TECNICA DE CAPACIDAD TOTAL DE FIJACION DE HIERRO (CTF) (23)

En un tubo de 13 X 100 mm colocar 0.9 ml de suero y agregar 0.9 ml de solución de hierro de 6 ug/ml. Mezclar e incubar 20 minutos a temperatura ambiente. Agregar 180 mg de

carbonato de magnesio. Mezclar e incubar 5 minutos.

Centrifugar 10 minutos a 3000 rpm y usar el sobrenadante para trabajarlo exactamente igual al suero completo en la técnica de hierro sérico.

TECNICA DE CAPACIDAD LIBRE DE FIJACION DE HIERRO (CLF) METODO

COLORIMETRICO (22)

En dos celdillas de 12 X 75 mm marcadas 1 y 2, colocar 0.5 ml de solución de ácido ascórbico al 0.5% en el tubo 1 y 0.5 ml de suero problema en el tubo 2. A ambos tubos añadir 1.5 ml de buffer B recién preparado según las instrucciones ya descritas. Mezclar ambos tubos y dejarlos reposar 15 minutos. Leer a 530 nm la DO del tubo 2 llevando a cero de DO con un tubo conteniendo agua (ésta es la DO-1 del tubo 2). Añadir 0.03 ml de batofenantrolina a ambos tubos y mezclar. A la 1 - 2 horas, leer los tubos 1 y 2 contra el tubo de agua (éstas son las lecturas DO-2 del tubo 2 y la DO del tubo 1).

La diferencia DO-2 menos DO-1 del tubo 2 y la lectura DO del tubo 1 son convertidas a  $\mu\text{g}$  de hierro/dl de la curva de calibración. La concentración de hierro del tubo 1 representa hierro añadido y la del tubo 2, el hierro que quedó libre, esto es, el hierro no fijado por la transferrina. Consecuentemente, la diferencia entre ambos (hierro tubo 1 menos hierro tubo 2) representa la capacidad libre de fijación del suero problema.

## CURVA DE CALIBRACION

A partir de la solución de hierro de 10 ug/ml, preparar las siguientes mezclas:

<u>Tubo</u>	<u>Agua</u>	<u>Sol de Fe</u>	<u>Concentración final</u>
1	5	0	0
2	4.5	0.5	100 ug/dl
3	4	1	200 ug/dl
4	3.5	1.5	300 ug/dl
5	3	2	400 ug/dl
6	2.5	2.5	500 ug/dl

Colocar, por duplicado, 0.5 ml de cada una de éstas mezclas en celdillas de 12 X 75 mm. Añadirles 1.5 ml de buffer glicina-HCL diluido y 0.03 ml de batofenantrolina, Mezclar y dejar reposar un mínimo de 1 hora. Leer a 530 nm las densidades ópticas de los tubos 2 a 6 llevando a cero con el tubo 1.

Trazar en papel milimétrico las DO en el eje de las ordenadas y las concentraciones correspondientes a cada tubo en el eje de las abcisas. También se pueden obtener los factores de las diferentes concentraciones de la curva:

$$\text{Factor} = \frac{\text{Concentración}}{\text{DO}}$$

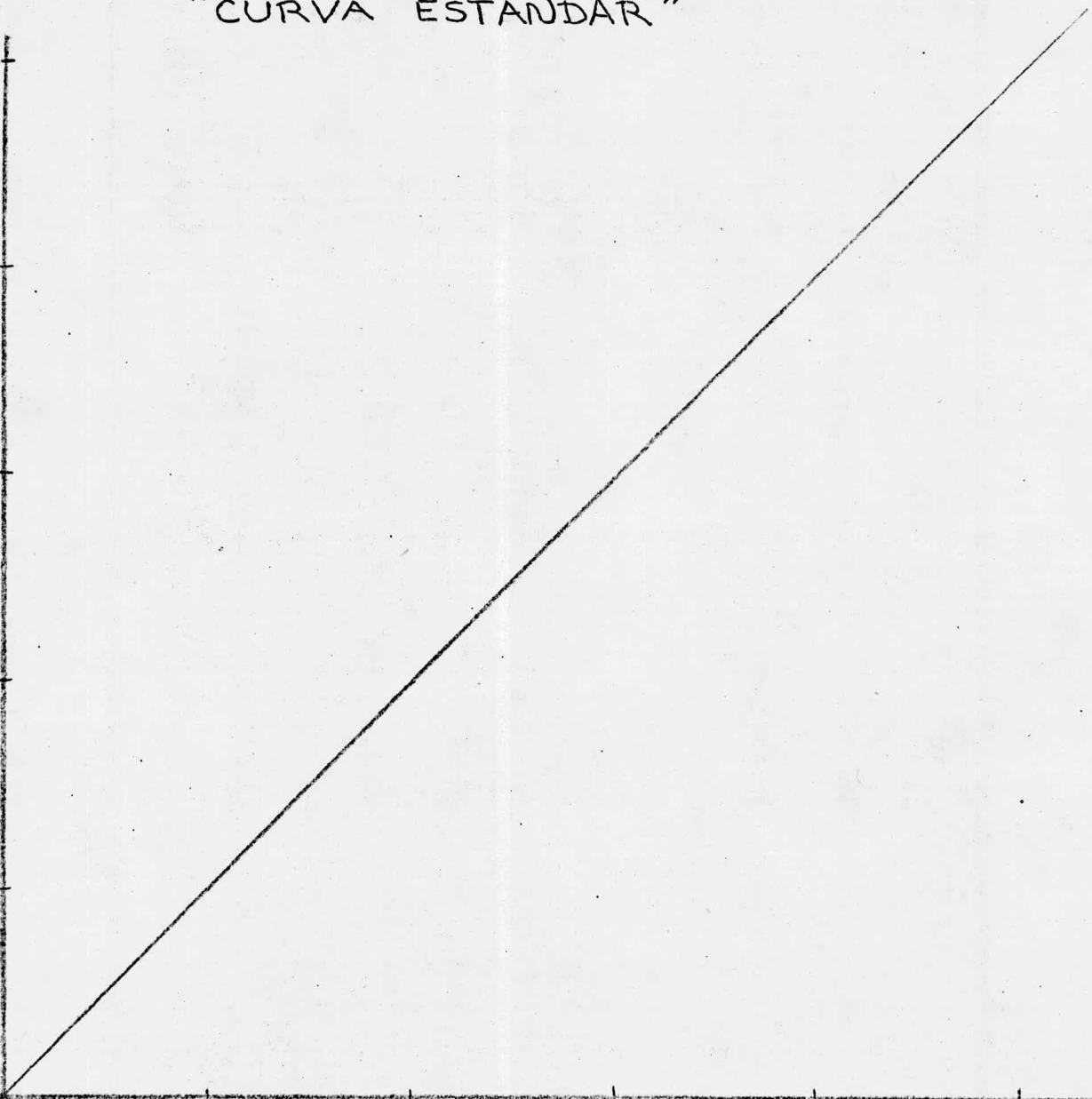
Los 5 factores deben ser similares. Promediar los factores y multiplicar el factor promedio por la DO neta del problema para obtener el hierro sérico en ug/dl.

Para la capacidad total de fijación, multiplicar el factor por dos ya que el suero se diluye 1:2 en la primera fase de la técnica. El resultado de la multiplicación será la capacidad total de fijación en ug/dl.

# "CURVA ESTANDAR"

DENSIDAD  
OPTICA

5  
4  
3  
2  
1



100 200 300 400 500

HIERRO ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )

CAPITULO 4

RESULTADOS



TABLA I

Resultado de hierro (Fe), capacidad total de fijación (CTF) y capacidad libre de fijación (CLF) de hierro de la transferrina en 24 sueros frescos.

<u>SUERO</u>	<u>Fe</u> <u>Ug/dl</u>	<u>CTF</u> <u>ug/dl</u>	<u>CLFi</u> <u>ug/dl</u>	<u>CLF</u> <u>ug/dl</u>	<u>(CLF/CLFi) 100</u>
1	59.5	187	127.5	130	101.9
2	91	244	153	127	83.0
3	94	249.5	155.5	144	92.6
4	108	268	160	148	92.5
5	33.5	208	174.5	177	101.4
6	173	347.5	174.5	155.5	89.1
7	49	236.5	197.5	171	86.5
8	132	330.5	198.5	192	96.7
9	83	281.5	199	176	88.4
10	76	278	202	180	89.1
11	92.5	296.5	212.5	183	86.1
12	70	287.5	217.5	207.5	95.4
13	57	282	225	190	84.4
14	47.5	273	225.5	202.5	89.8
15	82	317	235	215	91.4
16	79.5	346	266.5	247	92.6
17	44	327	283	246	86.6
18	65	353.5	288.5	266	92.2
19	28	383.5	355.5	343	96.5
20	103	434	331	309	93.3
21	29	436	407	368	90.4
22	90	515	425	397	93.4
23	32	460.5	428.5	440	102.6
24	69	538	469	467	99.5

$$\text{CLFi} = \text{CTF} - \text{Fe}$$

RESULTADOS DE CTF Y CLF HACIENDO LECTURAS DE DENSIDAD OPTICA DEL COMPLEJO  
 HIERRO-BATOFENANTROLINA I Y 2 HORAS DESPUES DE AGREGAR EL REACTIVO CROMOGENO

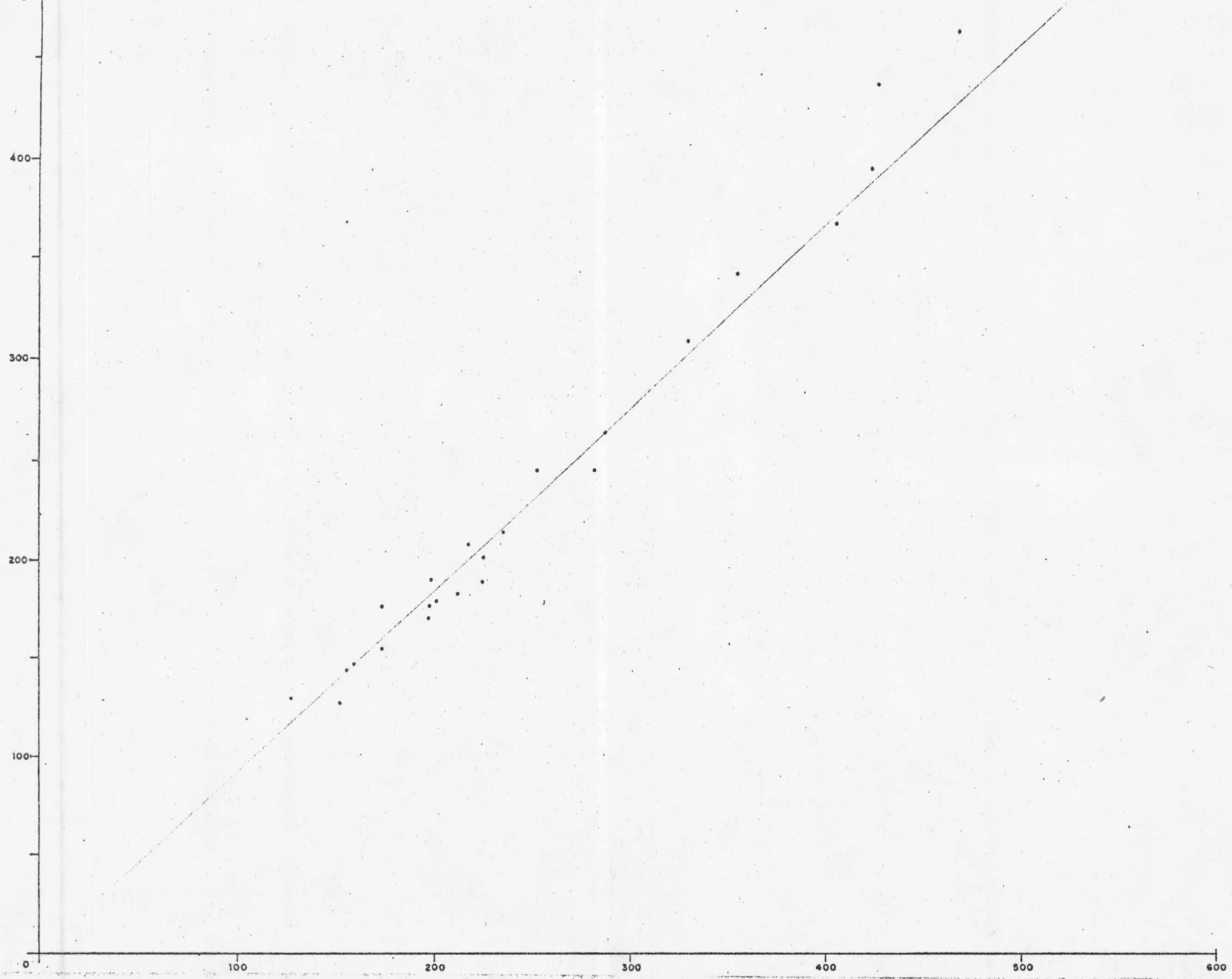
<u>Suero</u>	<u>CTF (ug/dl)</u>		<u>Diferencia</u> <u>2 hr - 1 hr</u>	<u>CLF (ug/dl)</u>		<u>Diferencia</u> <u>2 hr - 1 hr</u>
	<u>1 hr</u>	<u>2 hr</u>		<u>1 hr</u>	<u>2 hr</u>	
1	296.5	299.5	+ 3	183	167	- 16
2	281.5	280.5	- 1	176	157.5	- 18.5
3	328	326	- 2	246	236	- 10
4	436	440.5	+ 4.5	368	358.5	- 9.5
5	383.5	386.5	+ 3	343	339	- 4
6	434	439.5	+ 5.5	309	299.5	- 9.5
7	347.5	351.5	+ 4	155.5	145.5	- 10
8	236.5	225	- 11.5	171	164	- 7
9	346	359	+ 13	247	240.5	- 6.5
10	282	298	+ 16	190	185.5	- 4.5

RESULTADOS DE Fe, CLFi Y CLF, EN 12 SUEROS TRABAJADOS ANTES Y DESPUES DE LIOFILIZAR

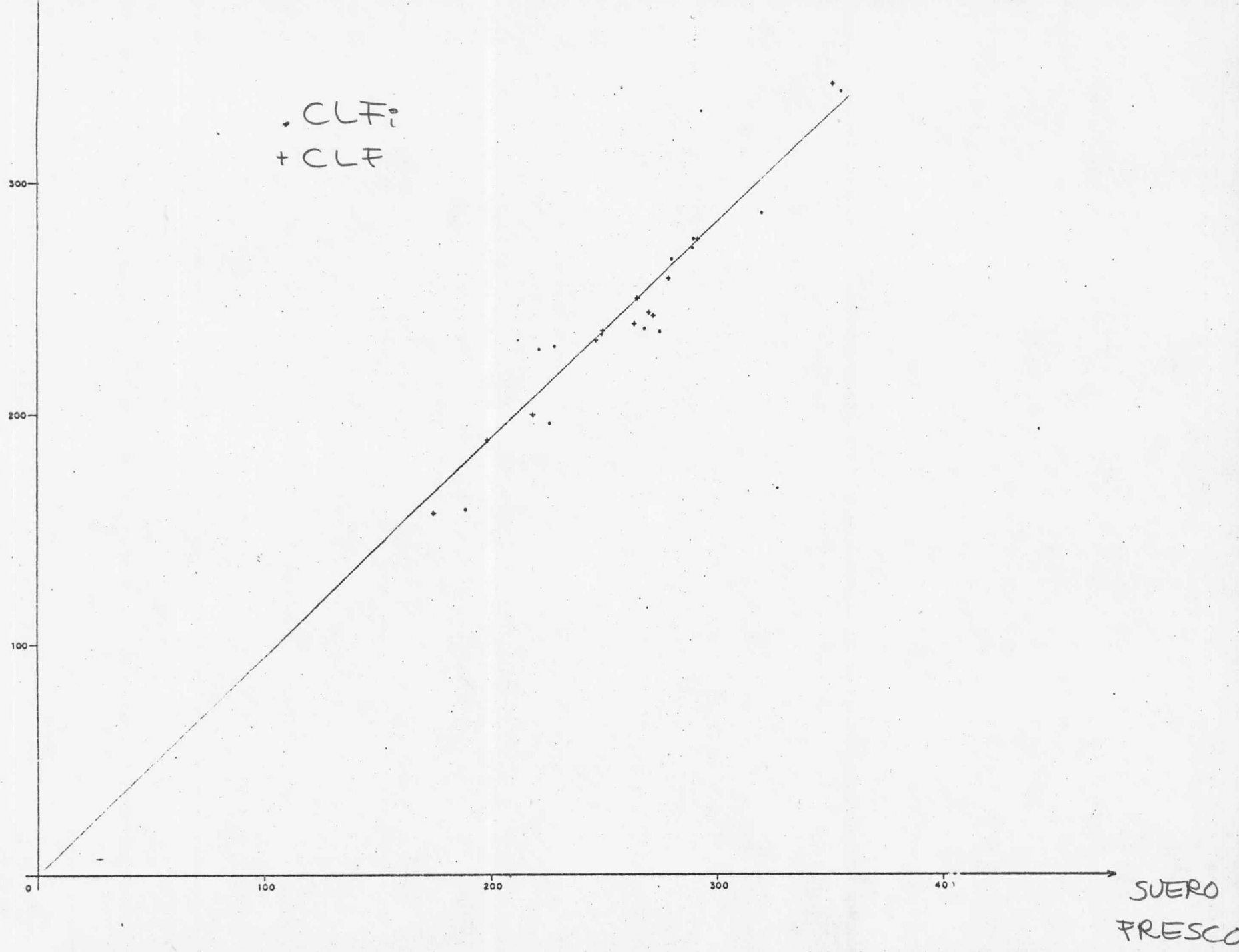
<u>Suero</u>	<u>HIERRO ug/dl</u>		<u>CLFi ug/dl</u>		<u>CLF ug/dl</u>	
	<u>Fresco</u>	<u>Liofilizado</u>	<u>Fresco</u>	<u>Liofilizado</u>	<u>Fresco</u>	<u>Liofilizado</u>
1	106	92	249	235	265	251
2	62	68	275	236	270	245
3	96	100	179	159	175	157
4	68	58	355	342	351	345
5	111	104	228	230	250	237
6	63	69	321	287	292	276
7	95	90	289	277	272	244
8	119	120	268	238	247	233
9	103	97	289	274	279	260
10	88	84	281	268	264	240
11	132	129	217	196	199	179
12	135	126	222	224	219	200
-						
X	98.16	94.75	264.41	247.16	256.91	238.91
DE	23.73	21.94	46.47	44.91	43.52	45.76

(g/dl)

GRAFICA · 1



CLFi  
( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )



CAPITULO 5

DISCUSION

En la tabla I se presentan los resultados de hierro, CLFi (CTF - Fe) y CLF, en 24 sueros frescos.

Comprando CLF y CLFi, con excepción de los sueros 1, 5 y 23 en los 21 sueros restantes se obtuvieron valores ligeramente mas bajos para CLF. En la gráfica I se muestra la correlación de los resultados de ambas técnicas.

Hubo una buena correlación en todo el rango estudiado (127-469 ug/dl). Faltaría comparar ambas técnicas con sueros con CLF por abajo de 127 ug/dl.

Una ventaja encontrada a favor del método de CTF, es que en este método el complejo hierro-batofenantrolina es menos afectado por tiempo, que en el método de CLF. En la tabla No. 2 se presentan los resultados de efecto de tiempo, para la CLF, se obtuvieron siempre valores más bajos, haciendo la lectura de DO-2 a las dos horas. Este fenómeno se debe probablemente a que la transferrina va soltando el hierro en forma lenta, y logicamente va aumentando el hierro libre que es el que se cuantifica en este método.

La tabla 3 muestra los resultados de Fe, CLFi y CLF en sueros trabajados antes y después de liofilizar, en general se obtuvieron valores mas bajos para las 3 determinaciones en el suero liofilizado que su correspondiente suero fresco. Si consideramos 100% el resultado obtenido en el suero antes de

liofilizar se tiene que para los sueros liofilizados en promedio se obtuvieron los siguientes porcentajes: 97.1, 93.4 y 92.6 para Fe, CLFi y CLF respectivamente. Las diferencias observadas se pueden atribuir a errores introducidos porque se diluye mas el suero al reconstituírlo con 3 ml de agua desionizada.

Si consideramos que los 7 g/dl de proteínas del suero ocupan aproximadamente un volúmen de 0.21 ml ( $\frac{7 \times 3}{100} = 0.21$ ), tal vez deberían reconstituírse con 2.79 ml de agua en vez de 3 ml.

La reproducibilidad entre duplicados en las tres técnicas (Fe, CLFi y CLF) para sueros antes y después de liofilizar osciló entre 0.8 y 3.1%.



CAPITULO 6

CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados se puede llegar a las siguientes conclusiones:

- 1.- En sueros frescos el método de CLF tiende a dar valores ligeramente mas bajos que usando el método CTF.
- 2.- Con ambos métodos se tiene muy buena reproducibilidad entre duplicados trabajados el mismo día.
- 3.- El hecho de no haber encontrado grandes diferencias en la capacidad de fijación de hierro a la transferrina en sueros antes y después de liofilizar plantea las siguientes posibilidades: que los iones bicarbonato necesarios para la unión específica de hierro a la transferrina provengan del agua usada para la reconstitución del suero liofilizado, que el CO<sub>2</sub> del ambiente se disuelva en el suero y por último que el suero al liofilizarlo, no pierda todos los iones bicarbonato.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFIA

- 1 Holmberg C.G and Laurell, C. B. Studies on the capacity of serum to bind iron. A contribution to our knowledge of the regulation mechanism of serum iron. Acta Phisiol. Scand., 10: 307, 1945.
- 2 Laurell, C. B. and Ingelman, B. the iron-binding protein of swine serum. Acta Chem. Scand., 1 : 770, 1947.
- 3 Schade, A. L. and Carolina, L. An iron-binding component in human blood plasma. Science., 104 : 340, 1946.
- 4 Surgenor, D. M., Koechlin, B. A. and Strong, L. E. Chemical, clinical and immunological studies on the products of human plasma factionation XXXVII. The metal combining globulin of human plasma. J. Clin. Invest., 28 : 73, 1949.
- 5 Schade, A. L., Reinhart, R. W. and Levy, H. Carbon dioxide and oxygen in complex formation with iron and siderophilin, the iron binding component of human plasma. Arch. Biochem., 20: 170, 1949.
- 6 Jamieson, G. A., Jett, M. and De Bernardo, S. L. The carbohydrate sequence of the glycopeptide chains of human transferrin. The J. of Biol. Chem., 246 : 3686, 1971.
- 7 Mann, K. G., Fish, W.W., Cox A. CH. and Tanford, CH. Single chain nature of human serum transferrin. Biochem

9 : 1348, 1970.

- 8 Bezkorovainy, A., Grohlich, D. and Gerbeck, C. Some physical chemical properties of reduced-alkylated and sulphitolysed human serum transferrins and hen's egg conalbumin, *Biochem. J.*, 110 : 765, 1968.
- 9 Aisen, P., Aasa, R., Malmstrom, B. G. and Vanngard, T. Bicarbonate and the binding of iron to transferrin. *J. Biol. Chem.*, 242: 2484, 1967.
- 10 Warner, R. C. and Weber, I. the metal combining properties of conalbumin. *J. Am. Chem. Soc.*, 75: 5094, 1953.
- 11 Komatsu, S. K. and Feeney, R. E. Role of tyrosyl groups in metal binding properties of transferrin. *Biochem*, 6: 1136, 1967.
- 12 Line, W. F., Grohlich, D. and Bezkorovainy, A. the effect of chemical modification on the iron binding properties of human transferrin. *Biochem.*, 6 : 3393, 1967.
- 13 Fletcher, J. and Huehns, E. R. Function of transferrin *Natures*. 218: 1211, 1968.
- 14 Ganz, R. Reticulocyte iron acquisition of iron from mono and biferric transferrinas. (anst). *Fed. Proc.*, 31 : 342, 1972.

- 15 Awai, M., Chipman, B., and Brown, E. B. In vivo support for the Fletcher-Huhens hypothesis of functional heterogeneity of transferrin bound iron. *Blood* 40: 942, 1972.
- 16 Roberts R. C., Makey, D. G. and Seal, U. S. Human transferrin molecular weight and sedimentation properties, *J. Biol. Chem.*, 241: 4907, 1966.
- 17 Jager, BV. Immunological studies of an iron-binding protein in human serum. *J. Clin. Invest.* 4 : 792, 1949.
- 18 Jandl, J. H. and Katz, J. H. The plasma to cell cycle of transferrin *J. Clin. Invest.*, 42 : 314, 1963.
- 19 Morgan, E. H. and Appleton, T. C. Autoradiographie localization of <sup>125</sup>I-labelled transferrin and reticulocytes. *Natures.*, 223 : 1371, 1969.
- 20 Bates, G. W. and Schalabach, M. R. the non specific binding of Fe<sup>3+</sup> to transferrin in the absence of synergistic anions. *J. of Biol. Chem.*, 250 : 2177, 1975.
- 21 Dorantes, S. and Alexander, B. Effects of liophilization and reconstitution of human plasma and serum in some blood clotting factors.
- 22 Loría, A. A. y Monge, B. Técnicas de dosificaciones séricas de hierro y de capacidad de fijación de hierro

Rev. Invest. Clin., 20 : 429, 1968.

- 23 Ramsay, W.N.M. The determination of the total iron binding capacity of serum. Clin. Chim. Acta., 2 : 221, 1957.