

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA

**EFFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN
SUERO SOBRE LAS MEDICIONES DE
HIERRO Y TRANSFERRINA.**

Celia Rosario Chiunti Vilaboa

Q. F. B. (Bioquímico Microbiólogo)

1978



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 1978

NO. 11-107 90
ECHA _____
RSC _____



PRESIDENTE, PROF. OSCAR AMOR DODERO.

VOCAL " JOSEFA PIEDRAS ROSS.

SECRETARIO " ESTHER GUTIERREZ HIDALGO.

1er SUPLENTE " LEONOR FERNANDEZ SALGADO.

2do SUPLENTE " CLEMENTINA BELAUNZARAN.

Sitio donde se desarrolló el tema: I.N.N.

Sustentante: Celia Rosario Chiunti Vilaboa. *Celia Rosario Chiunti*

Asesor de tema: Prof. Josefa Piedras Ross. *Josefa Piedras*

A mis padres

Sr. Don Juan Chiunti Rico

Sra. Doña Celia Vilaboa de Chiunti

Con profundo amor, respeto y agradecimiento.

A mis hermanos

Srita. C.D. Nelly Chiunti Vilaboa

Br. Fidel Salvador Chiunti Vilaboa

A mis abuelitos:

Sr. Don Julio Vilaboa Yépez

Sra. Doña Rosario Zarrabal de Vilaboa

Con admiración y respeto.

Sr. Don Fidel S. Chiunti Morell

Sra. Doña Josefa Rico Romero

A Tíos y Primos

A Bernardo

Mi Agradecimiento a:

la Srita. Q.F.B. Josefa Piedras Ross

al Sr. Q.B.P. Alvar Loría Acereto

Por su valiosa ayuda para la realización de esta tesis.

INTRODUCCION

Existe muy poca información en la literatura mundial respecto al efecto que tiene la residencia en zonas altas, sobre los valores hematológicos de sujetos normales. Ha ha bido estudios aislados realizados en sujetos que viven en 1300 a 2400 metros sobre el nivel del mar (1-5) y otros realizados en el Instituto Andino de Biología a 3700 y 4500 metros de altitud (6). De estos estudios parece quedar claro que los llamados valores de serie roja (hemoglobina, hematocrito y número de eritrocitos) aumentan con la altura, pero se sabe poco de los posibles cambios que pudieran haber en otras constantes hematológicas, tales como los niveles séricos de hierro y transferrina (la transferrina es una betaglobulina plasmática que transporta hierro plasmático para ser utilizado por la médula ósea en la síntesis de hemoglobina). En el único estudio al respecto (7) que encontramos en la literatura, existen cambios temporales en el nivel de hierro sérico al ser transportado un sujeto normal del nivel del mar a 4500 metros sobre este, pero que después de algún tiempo retorna a sus niveles iniciales. En relación a la cantidad de transferrina circulante no encontramos datos al respecto.

Como parte de un estudio sistematizado realizado en

un sólo laboratorio (o sea eliminando la variación interlaboratorios) se obtuvieron sueros de hombres y mujeres normales residentes en 5 alturas diferentes sobre el nivel del mar, en un intento de ver si había o no, diferencias en los niveles séricos de hierro y transferrina atribuibles a la altitud. Las muestras de sueros fueron obtenidas de unas 900 personas en los meses de enero a marzo de 1977.

El volumen de muestras obtenido no se pudo procesar de inmediato, por lo que todas se congelaron durante un periodo de 2 a 256 días antes de realizar las mediciones. Este hecho llevó a la observación a posteriori de que el tiempo de almacenamiento, una variable no prevista de antemano, afectó claramente los datos de transferrina. En el presente informe se presentan los datos que llevaron a este planteamiento a posteriori y que se complementan con un estudio prospectivo que comprueba que, el almacenamiento de suero por arriba de dos meses se refleja en los valores más altos de hierro y transferrina, cuando menos al ser medidos con metodologías que no requieren precipitación proteica.

MATERIAL Y METODOS

Los siguientes criterios se usaron en la seleccion de individuos para la toma de muestra del estudio retrospectivo.

1. Edad de 16 a 25 años en mujeres y de 16 a 29 años en varones.
2. Que las mujeres fueran nulíparas y que no estuvieran embarazadas.
3. Residencia en el lugar de estudio:
 - a) Por lo menos un año previo al estudio.
 - b) No haber permanecido más de 15 días en otras altitudes durante los 6 meses anteriores al estudio.
 - c) No haber visitado otras altitudes en los 8 días previos al estudio.
4. Consumo diario de cuando menos 30 g de proteína animal.
5. Durante los 6 meses anteriores al estudio no haber padecido de:
 - a) Enfermedad o mal febril por más de 8 días.
 - b) No presentar flujo sanguíneo evidente.
 - c) No haber donado sangre.
6. Ausencia de anormalidades en el examen físico, particularmente agrandamiento de hígado o bazo e ictericia.

Las ciudades seleccionadas, sus altitudes sobre el nivel del mar y número de individuos estudiados fueron:

Ciudad	Altura	No. de Sujetos.		
		Mujeres	Varones	Total
Veracruz	Nivel del mar	118	73	191
Orizaba	1000 metros	75	118	193
San Luis Potosí	1800 "	100	103	203
Puebla	2200 "	62	68	130
Toluca	2670 "	83	49	132
Total		438	411	849

Las muestras de sangre venosa fueron extraídas de los individuos en ayuno y sentados en posición vertical. Se tuvo cuidado de evitar estasis de sangre por remoción del torniquete antes de obtener la sangre. Se utilizaron 2 tubos al vacío para la obtención: uno con EDTA a una concentración final de 1.5 mg/ml, y el otro sin anticoagulante.

El material clínico del estudio prospectivo lo integraron 34 pacientes del Instituto Nacional de Nutrición a quienes se les extrajo suero para mediciones de hierro y transferrina. Las mediciones fueron hechas dentro de las 24 horas siguientes a la obtención del suero; el remanente del mismo se congeló. A distintos tiempos se volvieron a dosificar hierro y transferrina en los sueros que habían sido congelados de estas 34 muestras.

En ambos estudios, retrospectivo y prospectivo, la medición de hierro sérico se hizo con el método descrito por Loria y Monge (8) que se especifica a continuación:

Fundamento: En el suero existe hierro que está unido fuertemente a una globulina, la transferrina. La unión hierro transferrina es estable a pH arriba de 7, pero se disocia totalmente a pH abajo de 5. El método de medición usa esta propiedad para separar al hierro de la transferrina a base de añadir un amortiguador ácido. Una vez lograda la liberación de hierro, éste se mide espectro fotométricamente a base de agregar un agente cromógeno (batofenantrolina) que forma un compuesto colorido con el hierro ferroso.

Método. 1. En celdillas de 12 x 75 mm colocar:

Celdilla Blanco: 0.5 ml de solución salina

Celdilla Estándar 1: 0.5 ml de solución de hierro de 1.5 ug/ml

Celdilla Estándar 2: 0.5 ml de solución de hierro de 3.0 ug/ml

Celdilla Problema: 0.5 ml de solución de suero.

2. Agregar 1.5 ml de solución amortiguadora de trabajo a todas las celdillas. Mezclar adecuadamente y dejar reposar 20 minutos.
3. Leer en el espectrofotómetro a 530 nm la densidad óptica de las celdillas estándar y problema versus la celdilla blanco. Estas serán las DO-1 de estándares y problema.
4. Agregar 0.03 ml de batofenantrolina a todas las celdillas. Mezclar inmediatamente y dejar reposar 60 minutos.

5. Leer en las mismas condiciones del paso 3, la densidad óptica de estándares y problema versus la celdilla blanco. Estas serán las DO-2.

Cálculos. 1. Restar las DO-1 de la DO-2 en cada una de las celdillas estándares y problema. Estas serán las DO netas.

2. Obtener los factores de las celdillas estándares 1 y 2:

Factor Estándar 1 = 150 entre DO neta de estándar 1

Factor Estándar 2 = 300 entre DO neta de estándar 2

3. Los 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 (microgramos por decilitro).

Reactivos. 1. Solución amortiguadora concentrada: en vaso de precipitados de 200 ml colocar 1.5 gramos de glicina, disolverla en 60 ml de agua, y ajustar el pH a 1.9 con HCl. Pasar la solución cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml, aforar a la marca con agua y se guarda refrigerada.

2. Solución amortiguadora de trabajo: a cada volumen de amortiguador concentrado agregar dos volúmenes de solución acuosa de ácido ascórbico al 0.5 % (esta última debe ser fresca). La cantidad de amortiguador que se prepara dependerá del número de celdillas que se vayan a trabajar ese día.

3. Batofenantrolina: Colocar 150 mg de batofenantrolina

sulfonatada en un matraz volumétrico de 25 ml. Aforar con agua destilada, mezclar y se guarda refrigerada.

4. Solución madre de hierro: en un matraz volúmetrico de 250 ml colocar 175.5 mg de sulfato ferroso-amónico hexa hidratado (o bien 25 mg de alambre de hierro Q.P.). Agregar 1.25 ml de ácido sulfúrico concentrado hasta que la sal (o el alambre) se disuelva. Agregar unos 100 ml de agua, a continuación ir agregando gota a gota una solución muy diluida de permanganato de potasio hasta que aparezca un ligero tinte violeta. Aforar a 250 ml con agua. Esta solución es estable a temperatura ambiente (TA) y contiene 100 ug/ml de hierro.
5. Soluciones de hierro de 1.5 y 3.0 ug/ml: colocar 1.5 y 3.0 ml de la solución madre de hierro, respectivamente, en matraces volumétricos de 100 ml y aforarlos con agua.

Nota. 1. Todo el material de vidriería y el agua deben estar libres de hierro.

La capacidad de fijación total se midió usando el método de Ramsay (9) modificado este consiste en que no se realiza la precipitación proteica entre fases 1 y 2 (ver abajo):

Fundamento. En el suero existe una globulina, la transferrina que fija fuertemente al hierro. Normalmente parte de la transferrina está unida a hierro y parte está libre de hierro. Para medir la capacidad de fijación total (la de transferrina libre más la de transferrina unida al

hierro) se agrega hierro en exceso al suero y se incuba la mezcla para asegurarse que toda la transferrina quede unida al hierro. Después se agrega carbonato de magnesio y se centrifuga para eliminar el hierro libre en exceso (que quedará adsorbido en el precipitado del carbonato) del hierro unido a transferrina (que estará contenido exclusivamente en el sobrenadante). Una dosificación de hierro en el sobrenadante permitirá conocer la capacidad de fijación total del suero problema.

Análisis del Método. Puede considerarse dividido en dos fases:

Fase 1 = Saturación de la transferrina con hierro y eliminación del exceso de hierro no fijado por la transferrina.

Fase 2 = Medición del hierro en el sobrenadante utilizando para ello el método para medir hierro sérico.

- Fase 1.
1. Colocar 0.9 ml de suero problema en un tubo de 13 x 100 mm.
 2. Agregar 0.9 ml de solución de hierro de 6 ug/ml. Mezclar y dejar reposar 20 minutos.
 3. Agregar aproximadamente 200 mg de carbonato de magnesio en polvo. Mezclar vigorosamente, tapar el tubo y dejar reposar 5 minutos.
 4. Centrifugar (cabezal vertical) a 3000 rpm durante 10 minutos.
 5. Extraer con propipeta un mínimo de 1.0 ml de so

sobrenadante en celdillas de 12 x 75 mm.

- Fase 2.
1. Medir el hierro de los sobrenadantes siguiendo el método de hierro sérico como si los sobrenadantes fueran suero problema.
 2. El dato de concentración de hierro obtenido en los sobrenadantes se multiplica por 2 ya que el suero ha sido diluido 1:1 en la fase 1 del proceso. El resultado de la multiplicación será la capacidad de fijación total en ug/dl.

- Reactivos.
1. Solución de hierro de 6 ug/ml: colocar 6 ml de la solución madre de hierro (ver método de hierro sérico) en matraz volumétrico de 100 ml y aforar con agua. Es estable a TA.
 2. Carbonato de magnesio anhidro en polvo. En cada nuevo frasco, el operador deberá cerciorarse de que el carbonato es capaz de fijar todo el hierro libre. Para ello hacer una medición en que se substituya el suero problema por solución salina desde el paso 1 de la fase 1: el sobrenadante de salina deberá tener, si acaso, trazas de hierro.
 3. Los reactivos de la medición de hierro sérico.

Nota 1. Existen sueros anormales en que toda la transferrina esta unida a hierro (saturación de transferrina 100 %). En tales casos, el hierro será igual a la capacidad de fijación total. Pero no deben aceptarse resultados en que el hierro sérico sea substancialmente mayor que la

capacidad: tal situación indica error en una o ambas mediciones, o bien la presencia en suero de hierro tisular o de hierro terapéutico dado por vía parenteral.

Nota 2. Si se carece de propipeta para extraer sobrenadante sin tomar precipitado de carbonato, puede decantarse el sobrenadante en un tubo limpio (paso 1 de la fase 1) para de allí tomarlo sin carbonato. Este recurso es poco recomendable ya que aumenta el peligro de contaminación con hierro

Es conveniente hacer ambas mediciones (hierro y transferrina) para obtener la saturación de transferrina que es un mejor índice clínico. La saturación de la transferrina es el porcentaje de la transferrina que sí está unida a hierro en el suero problema. Se obtiene:

Saturación (%) = $(\text{hierro sérico} \times 100) / \text{capacidad de fijación total}$.

Normalmente el suero humano tiene saturación de 40 ± 20 %.

Posibilidades:

Menos de 10 % indica deficiencia franca de hierro.

10-15 % deficiencia de hierro, infección, carcinoma.

15-19 % generalmente infección o carcinoma.

20-40 % con hierro sérico bajo indica desnutrición severa.

Más de 60 % indica falta de utilización (eritropoyesis disminuída) o sobrecarga (hemocromatosis).

Notas Adicionales

I. Vidriería. Todo el material de vidriería usado en ambos métodos debe estar libre de hierro.

La cristalería queda 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.

II. Agua libre de hierro. Pasarla por un sistema demineralizador "Deeminac" o "Deeminizer" de la Crystal Research Laboratories. Puede substituirse sin introducir errores por solución salina comercial.

III. Método de hierro sérico.

1. Paso 1: pipetear las soluciones usando pipetas subterminales, de modo que las alícuotas de 0.5 ml sean exactas.
2. Paso 2: igual recomendación de pipetas subterminales para pipetear amortiguador de trabajo.
3. Paso 3: comprobar, inmediatamente antes de leer, que no haya burbujas de aire adosadas a las paredes de las celdillas (tienden a formarse a medida que se alarga la incubación del paso 2).

4. Deben respetarse los tiempos dados en los sueros hemolizados, ya que el amortiguador ácido tiende a liberar hierro hemoglobínico. En el caso de sueros normales, lipémicos o ictericos, los tiempos dados pueden alargarse sin introducir error. Esta recomendación para sueros hemolizados puede aplicarse también en la medición de capacidad de fijación.
5. El factor promedio (paso 2 de los Cálculos) debe oscilar alrededor de 1100 en celdillas de 12 mm de ancho y espectrofotómetro Coleman.
6. Se recomienda trabajar todas las celdillas por duplicado para estar más seguros de los resultados obtenidos.
7. El suero humano contiene normalmente 120 ± 40 ug/dl de hierro.

IV. Método de capacidad de fijación total.

1. Pasos 1 y 2 de Fase 1: emplear pipetas subterminales.
2. Paso 3 de Fase 1: los 200 mg de carbonato están en exceso y por ello no hay necesidad de pesarlos exactamente. Puede usarse la boca ancha de una pipeta pasteur para la adición (se hace una marca con lápiz graso del volumen que ocupan 200 mg del carbonato usado).
3. El suero humano tiene normalmente una capacidad de 340 ± 60 ug/dl.

V. Reactivos. En general, los reactivos tienen trazas de hierro que no interfieren en la medición. Para comprobación debe confirmarse que la celdilla blanco del método de hierro sérico tenga una densidad óptica baja (menos de 0.010 habitualmente) al ser leída contra agua en el paso 5 del método de hierro.

RESULTADOS

Los resultados del estudio retrospectivo se muestran en la tabla 1: se observa que el grupo de sueros que permanecieron almacenados entre 1 y 1.8 meses prácticamente no discrepa (menos de 1%) de los valores promedio de hierro y transferrina vistos en el grupo que se almacenó menos de un mes. A partir de los 2 meses de almacenamiento se observó que hay un incremento tanto de hierro sérico (3, 6 y 9 %) como de transferrina (6, 10 y 37 %) con respecto al promedio del grupo inicial (el de menos de un mes de almacenamiento) en función del tiempo de almacenamiento. Estos fenómenos se observan con mayor claridad en las Figs 1 y 2: los sueros almacenados entre 7 a 8.5 meses tienen valores promedio de transferrina notablemente altos (Fig 2) mientras que los incrementos de hierro son menores (Fig 1).

La tabla 2 muestra los resultados del estudio prospectivo: se observa, al igual que en el estudio retrospectivo, que las alícuotas de los sueros almacenados durante 1.8 meses no presentan cambio significativo de hierro y transferrina en comparación con los datos obtenidos en alícuotas frescas de los mismos sueros, pero a partir de los 2,9 meses de almacenamiento, las alícuotas almacenadas tienen valores promedio mayores tanto de hierro como de transferri-

na (valores altamente significativos por la prueba t parea da). A semejanza del estudio retrospectivo, en el estudio prospectivo los incrementos de hierro son graduales a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento, pero a diferen cia del estudio retrospectivo, los valores de transferrina no guardan relación estricta de incremento en función del tiempo de almacenamiento ni los aumentos de transferrina son tan altos como en el estudio retrospectivo. Posiblemente la explicación de estas incongruencias es el hecho de que el incremento de hierro y transferrina con el tiempo de almacenamiento no ocurre en todos los sueros. La Fig. 3 muestra los comportamientos individuales de cambios en el nivel de hierro sérico de los sueros de la tabla 2. Hay 7 sueros (2 de los almacenados durante 2.9 meses y 5 de los almacenados durante 4.3 meses) que no mostraron incrementos substanciales de hierro. Este mismo fenómeno se observó en el caso de la transferrina (Fig. 4) pero solamente en 3 sueros (1 almacenado por 6.9 meses y 2 almacenados durante 4.3 meses; estos últimos no corresponden a los 5 sueros de este grupo que no mostraron alza de hierro). Acorde con la posibilidad de que no todos los sueros se comportan igual, está el aumento del coeficiente de variación de los valores de transferrina en los sueros almacenados durante 7-8.5 meses del estudio retrospectivo (Tabla 1).

DISCUSION

Hasta donde sabemos no hay antecedentes a este estudio ya que aparentemente es la primera vez que se informan cambios en las mediciones de hierro y transferrina que obedecen a tiempo de almacenamiento de la muestra congelada.

Llama la atención la diferencia de incrementos de transferrina entre el estudio retrospectivo y el prospectivo posiblemente tal diferencia (mayor incremento en el estudio retrospectivo) se debió a que el grupo con mayor tiempo de almacenamiento en el estudio retrospectivo (7 a 8.5 meses de la tabla 1) fue el que tenía una mayor cantidad de hemoglobina y que la liberación de hierro hemoglobínico contribuyó a incrementar los valores de transferrina, (esta se mide en este estudio en términos de hierro y no de proteína). A pesar de esta discrepancia, creemos que el estudio prospectivo, si bien no está constituido por una gran casuística, es lo suficientemente concluyente para dejar fundamentado el fenómeno de que el almacenamiento de los sueros congelados por arriba de dos meses, se traduce en un aumento de los niveles de hierro y transferrina en una gran mayoría de sueros; si bien existen ocasionalmente sueros que no muestran el fenómeno.

Finalmente, es importante notar que en este estudio

se emplearon métodos en los cuales no hay precipitación proteica previa a la medición o sea, son métodos que se realizan en suero completo. Por ello nuestros resultados plantean la necesidad de comprobar si el almacenamiento del suero a largo plazo es capaz de afectar el hierro y la transferrina cuando éstos son medidos por medio de métodos en que se realiza, previamente a la medición, la precipitación de las proteínas séricas.

T A B L A 1

Promedio (\bar{x}), desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV) del hierro sérico (ug/dl) y de la capacidad de fijación total (transferrina) (ug/dl) en función del tiempo de almacenamiento congelado.

Tiempo de Almacenamiento	n	Hierro Sérico (ug/dl)					Transferrina (ug/dl)				
		\bar{x}	s	CV	(1)	(2)	\bar{x}	s	CV	(1)	(2)
Menos de 1 mes	278	137	31.1	23	-	-	345	48.8	14	-	-
1 - 1.8 meses	177	135	32.4	24	- 2	- 1	349	42.4	12	+ 4	+ 1
2 - 2.8 "	154	142	28.8	20	+ 5	+ 3	365	48.6	13	+ 20	+ 6
3 - 4.8 "	132	146	35.0	24	+ 9	+ 6	380	49.3	13	+ 35	+10
7 - 8.5 "	109	150	38.4	26	+13	+ 9	473	92.1	19	+128	+37

- (1) Incremento sobre valor promedio del grupo de menos de 1 mes en ug/dl.
 (2) Incremento sobre valor promedio del grupo de menos de 1 mes en %.

T A B L A 2

Datos promedio de hierro y transferrina en los 34 sueros del estudio prospectivo. Se midieron en alícuotas de suero recién obtenido (fresco) y se repitieron en alícuotas que permanecieron almacenadas congeladas (Alm.) por tiempos diversos.

Tiempo de Almacenamiento	n	Hierro Sérico (ug/dl)						Transferrina (ug/dl)					
		Fresco	Alm.	(1)	(2)	t	p	Fresco	Alm.	(1)	(2)	t	p
1.8 meses	5	79	83	+ 4	+ 5	1.28	NS	222	224	+ 2	+ 1	1.68	NS
2.9 "	5	102	111	+ 9	+ 9	3.65	*	307	361	+54	+17	5.58	**
4.3 "	12	56	66	+10	+17	3.11	**	373	407	+34	+ 9	6.86	**
5.5 "	6	108	128	+20	+18	11.30	**	338	381	+43	+13	4.83	**
6.9 "	6	-	-	-	-	-	-	346	378	+32	+ 9	3.48	*

(1) = Incremento en ug/dl (Alm. - Fresco).

(2) = Incremento en % de valor fresco (100(Alm. - Fresco)/Fresco).

NS = Diferencia no significativa por prueba t pareada.

* = p menor de 0.020 por prueba t pareada.

** = p menor de 0.005 por prueba t pareada.

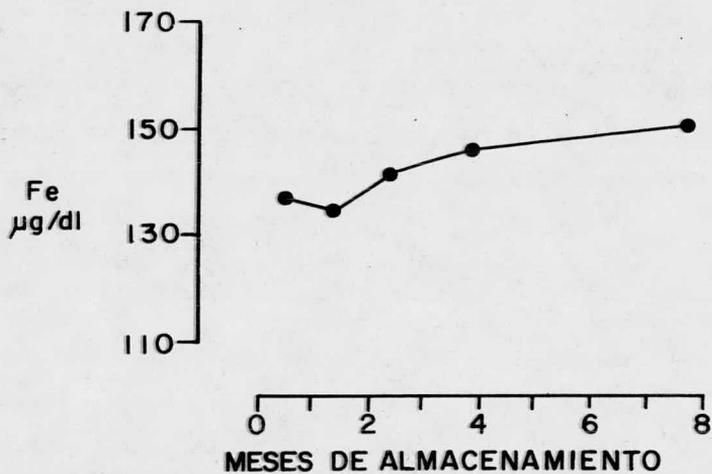


FIGURA 1

Comportamiento de los valores promedio de hierro sérico (ug/dl) en relación a los meses de almacenamiento de la muestra congelada.

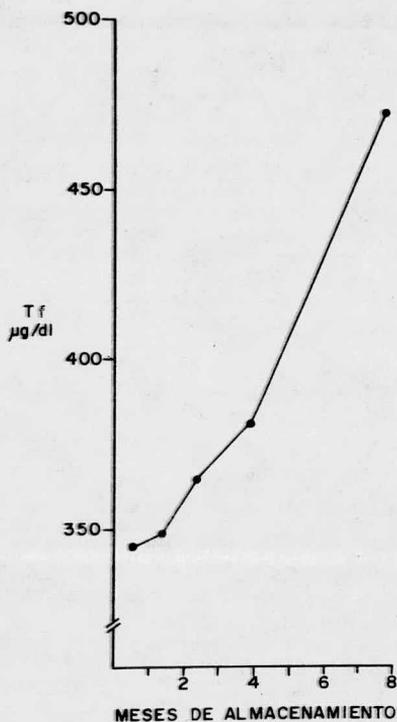


FIGURA 2

Comportamiento de los valores promedio de capacidad de fijación total (transferrina) ($\mu\text{g}/\text{dl}$) en relación a los meses de almacenamiento del suero congelado.

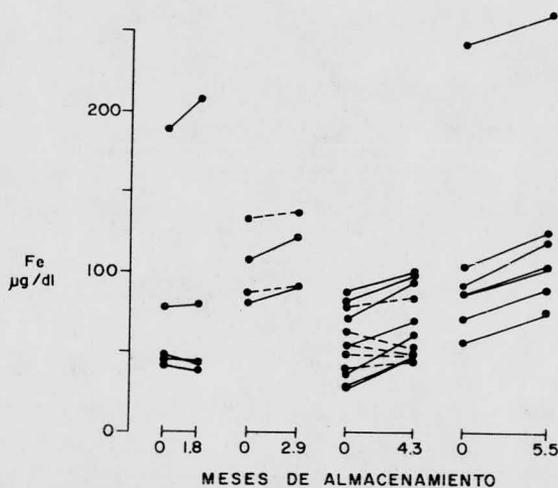


FIGURA 3

Comportamiento individual de los valores de hierro sérico (ug/dl) en alícuotas frescas y en alícuotas congeladas almacenadas durante tiempos distintos. Hubo siete sueros (·---·) que no mostraron incremento substancial de hierro sérico con más de 2 meses de almacenamiento.

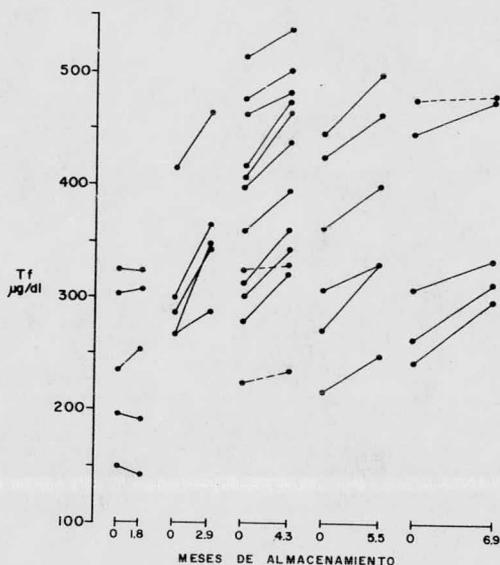


FIGURA 4

Comportamiento individual de los valores de capacidad de fijación total (transferrina) ($\mu\text{g}/\text{dl}$) en alícuotas frescas y en alícuotas almacenadas, de muestras congeladas durante tiempos distintos. Hubo tres sueros (·---·) que no mostraron incremento substancial de hierro sérico con más de 2 meses de almacenamiento.

BIBLIOGRAFIA

1. Robles Gil, J. & González Terán, D.: Determination of the number of erythrocytes, volume of packed cells, hemoglobin and other hematologic standards in Mexico City (altitude: 7457 feet). Study made on two hundred healthy persons. *Blood* 3: 660, 1948.
2. Wintrobe, M. M.: *Clinical Hematology*. Lea & Febiger Philadelphia. 6th ed, p 90, 1967.
3. Hofvander, Y.: Hematological investigation in Ethiopia with special reference to a high iron intake. *Acta Med. Scand. Suppl.* 494, 1968.
4. Loría, A., Piedras, J., Labardini, J. & Sánchez-Medal, L.: Anemia nutricional. I. Valores de serie roja en varones adultos sanos residentes a 2240 metros sobre el nivel del mar. *Rev. Invest. Clin.* 23: 3, 1971.
5. Piedras, J. & Loría, A.: Anemia nutricional. VII. Valores de serie roja en mujeres nulíparas sanas residentes a 2240 metros sobre el nivel del mar. *Rev. Invest. Clín.* 30: 241, 1978.
6. Merino, C. F.: Studies on blood formation and destruction in the polycythemia of high altitude. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 123: 478, 1966.
7. Reynafarje, C., Lozano, R. & Valdivieso, J.: The polycythemia of high altitudes: iron metabolism and related aspects. *J. Lab. Clin. Med.* 57: 848, 1961.
8. Loría, A. & Monge, B.: Técnicas de dosificación de hierro y de capacidad de fijación de hierro. *Rev. Invest. Clín.* 20: 429, 1968.
9. Ramsay, W. N. M.: The determination of the iron-binding capacity of serum. *Clin. Chim. Acta.* 2: 221, 1957.

Este Trabajo se imprimió en los Talleres
Gráficos de Guadarrama Impresores, S. A.
Av. Cuauhtémoc 1201, Col. Vértiz Narvarte,
México 13, D. F., Tel. 559 22 77, con 3 líneas.