

**MODIFICACION DE LOS METODOS
DE SCHADE Y COLABORADORES EN
COMPARACION CON OTROS METO-
DOS, E INFLUENCIA DE LA LIPEMIA,
ICTERICIA Y HEMOLISIS SOBRE LOS
RESULTADOS.**



NIDIA DELGADILLO BERMUDEZ

MEXICO, D. F.

1962



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.

UNIVERSIDAD MOTOLINIA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



● **Modificación de los Métodos de Schade y Colaboradores en Comparación con otros Métodos, e Influencia de la Lipemia, Ictericia y Hemólisis sobre los resultados.**

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a :

NIDIA DELGADILLO BERMUDEZ

Gracias te doy Señor por haberme permitido
llegar a la culminación de mi carrera

A mis queridos padres con cariño y gratitud.

A mis hermanos con cariño.

A mi tía Sol con cariño
y agradecimiento.

Con todo respeto al Exmo. Sr. Obispo
Isidro Augusto Oviedo y Reyes.

A la Rvda. Madre Elena Sempere F.

A la Rvda. Madre Rosario Coballos R.

Con mi agradecimiento y estimación al Sr.
Ing. Francisco Durán M. y fam.

Hago presente mi agradecimiento a los Laboratorios Clínicos de México y al Hospital de Nutrición, por permitir el desarrollo de esta Tesis bajo la dirección del Sr. Dr. Luis Sánchez Medel, así como la valiosa cooperación del Ing. Albar Loria y de la Srta. Q. E. B. Esther Ochoa Ríos.

C O N T E N I D O :

INTRODUCCION.

MATERIAL Y METODOS.

RESULTADOS.

COMENTARIO Y CONCLUSIONES.

BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION

A.- Metabolismo del hierro.

El hierro forma parte de la alimentación ordinaria - en forma de compuestos orgánicos e inorgánicos. Su total en la dieta diaria habitual es de 10 a 20 miligramos.

Para que el hierro pueda ser absorbido es necesario que esté en estado iónico reducido (ión ferroso) lo cual se lleva a cabo bajo el efecto del medio ácido del estómago y de sustancias reductoras de la misma dieta, tales como el ácido - ascórbico y la cistefna. Antiguamente se creía que para la ionización del hierro era indispensable el ácido clorhídrico del estómago; estudios recientes han demostrado que los ácidos orgánicos contenidos en la alimentación (acético, láctico y cítrico) cumplen adecuadamente con esa función.

La cantidad de hierro que se absorbe diariamente en condiciones normales equivale aproximadamente al diez por ciento del que se ha ingerido, o sea 1 a 2 miligramos. La absorción tiene lugar, en su mayor parte, en la parte proximal del intestino delgado (duodeno y yeyuno). El control de la absorción del hierro se realiza por un mecanismo incompletamente conocido (1).

Una vez presente el hierro en las células de la mucosa intestinal, se oxida y se combina con la apoferritina, proteína que al enlazarse con los iones férricos se denomina ferritina, derivado que contiene un 23 por ciento de hierro. Esta ferritina constituye un depósito temporal en el intestino - ya que se reduce nuevamente a ión ferroso y abandona el intes-

tino para entrar al plasma, en donde es inmediatamente oxidado otra vez al estado férrico. Allí se combina con una proteína de transporte denominada transferrina o siderofilina (beta - globulina fijadora de hierro) y en esta forma, la transferrina transporta el hierro de una manera muy parecida a como la hemoglobina transporta el oxígeno en la sangre. Sin embargo, las dos terceras partes de la transferrina están normalmente desprovistas de hierro; esta porción libre constituye la que se llama la capacidad latente o libre de fijación de hierro.

Del plasma, el hierro puede ser utilizado, puede ir a los órganos de almacenamiento o puede ser excretado.

La parte de hierro plasmático utilizado llega a la médula ósea para la síntesis de la hemoglobina principalmente y otra pequeña cantidad es usada para la formación de mioglobina y de diferentes enzimas respiratorias celulares: citocromo oxidasa, dehidrogenasa succínica y catalasa.

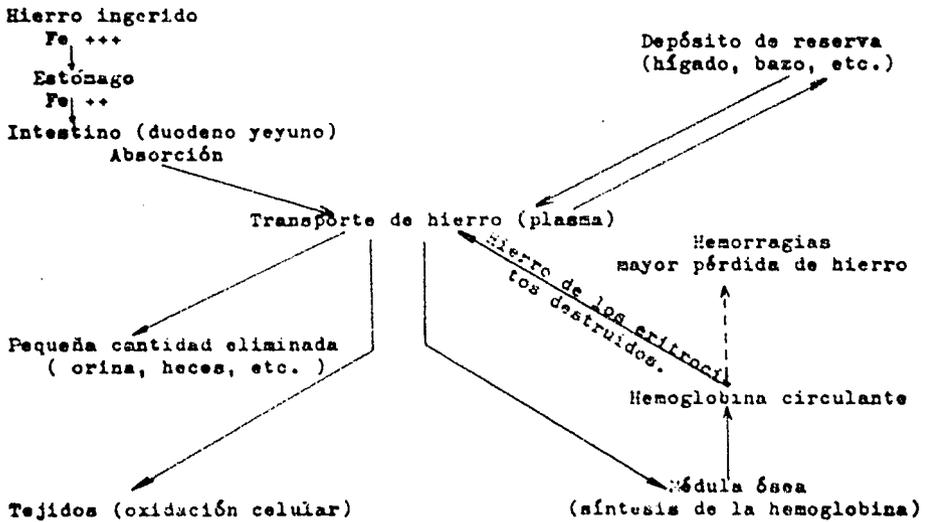
En los tejidos es almacenado en forma de ferritina o hemosiderina. El hígado representa el órgano de almacenamiento más importante, seguido por el bazo y la médula ósea.

De los 27 miligramos de hierro que diariamente se movilizan como promedio de un adulto de 60 Kg. a través del plasma, 20 miligramos derivan directamente del catabolismo de los eritrocitos y el restante proviene del ingerido y del ya almacenado. Esto significa que el hierro liberado en el catabolismo de los glóbulos rojos es rápidamente utilizado, como lo es también el que entra en la circulación proveniente de -

las células de la mucosa intestinal; el hierro de los sitios de almacenamiento es utilizado aparentemente en última instancia.

En resumen, el ciclo metabólico del hierro dentro del organismo es: del intestino al plasma y de éste a la médula ósea o a los órganos de depósito como hígado y bazo. El hierro de la médula ósea es incorporado a la hemoglobina de los eritrocitos y al destruir éstos, es reutilizado en la formación de hemoglobina para nuevos eritrocitos. De aquí que una característica muy importante del metabolismo del hierro, sea la forma tan eficiente como el organismo conserva este metal constituyendo virtualmente un sistema cerrado. Su excreción es muy baja y tiene lugar principalmente por las heces, orina, sudor, descamación celular y en la mujer por la pérdida menstrual principalmente.

RESUMEN ESQUEMATICO DEL METABOLISMO DEL HIERRO (2).



8.- Importancia clínica de las determinaciones de los parámetros séricos del hierro.

El estudio de los niveles de hierro plasmático es de gran importancia ya que éste aumenta o disminuye en diferentes enfermedades: anemias, hepatopatías, infecciones y aquellas en las que hay alteraciones en el metabolismo de la hemoglobina.

Citaremos algunas enfermedades en que el nivel de hierro plasmático se encuentra alterado para enfatizar la importancia clínica de esta constante, sobre todo en la diferenciación de anemias.

En la gran mayoría de las anemias hipocrómicas, el hierro sérico es bajo y la capacidad de fijación alta; pero uno de los casos en que las determinaciones de hierro sérico son de gran importancia, es en la diferenciación de las anemias hipocrómicas hipoferrémicas de las hiperferrémicas, ya que el tratamiento es diametralmente opuesto según sea uno u otro tipo de anemia (3).

En efecto, las debidas a carencia de hierro se caracterizan por tener hierro sérico bajo y capacidad de fijación elevada, mientras que las hipocrómicas debidas a utilización deficiente de hierro, éste se encuentra elevado en el suero y la capacidad de fijación es baja o nula (4).

En las anemias hemolítica, pernicioso e hipoplástica, el hierro sérico es alto y la capacidad de fijación baja (5).

En las infecciones y en el período de hemopoyesis activa, el hierro sérico es bajo y, por lo que se refiere a la capacidad de fijación, ésta es baja en las infecciones (6).

En las hepatitis se ha observado un aumento de hierro sérico, en contraste con los valores normales de ambos parámetros vistos en la ictericia debida a obstrucción biliar - extrahepática.

En la hemocromatosis y después de transfusiones, es común encontrar un aumento de hierro sérico, a menos que estén presentes otras complicaciones como infecciones o neoplasias.

En el embarazo, el hierro sérico es generalmente bajo y la capacidad de fijación, alta (6).

C.- Objeto del trabajo.

En los últimos años han aparecido diferentes métodos para medir la concentración de hierro en el suero y la cantidad de transferrina del mismo, a los cuales se les han señalado dos ventajas fundamentales sobre los métodos previamente utilizados para tal fin:

- a).- Ser técnicamente más simples.
- b).- Dar resultados exactos en condiciones bajo las cuales los métodos anteriormente empleados dan resultados erróneos.

Entre los métodos de aparición reciente destacan aquellos en que la base de las dosificaciones radica en el efecto que tienen, sobre el complejo hierro-transferrina, los cambios en el pH del suero. A diferencia de los métodos antiguos, la dosificación del hierro se hace en el mismo suero eliminándose la etapa de desproteínización del mismo. De ellos, el primero en aparecer en la literatura médica fue el de Schade, Oyama, Reinhart y Miller (8). Estos autores desarrollaron técnicas para determinar tanto el hierro sérico como la capacidad de fijación de hierro sin necesidad de desproteínizar la muestra.

Dada la utilidad, antes expuesta, que tiene en la clínica conocer los parámetros séricos del hierro en los enfermos, así como la ventaja que se han señalado para los métodos de Schade y Col., se consideró conveniente comprobar la exactitud de ellos y su utilidad en aquellas situaciones en que los métodos más difundidos dan resultados erróneos, es decir cuando los sueros están lipémicos, icterícos o hemolizados.

MATERIAL Y METODOS

El material estuvo constituido por sueros obtenidos de:

- 1) Personas normales en ayunas.
- 2) Personas normales después de haber ingerido alimentos ricos en lípidos, a fin de obtener sueros lipémicos.
- 3) Sujetos con ictericia.
- 4) Mezclas de sueros "normales"* con sueros lipémicos o ictériscos o bien de sueros "normales" con cantidades significativas de hemoglobina libre.

El efecto de la lipemia, la ictericia y la hemólisis se investigó determinando el hierro sérico y la capacidad de fijación de hierro por los métodos siguientes:

- 1.- Los de Schade y Cols. (8) para dosificar hierro sérico y capacidad de fijación de hierro: ambos se modificaron ya que se empleó batofenantrolina en vez de terpiridina para las dosificaciones.
- 2.- El de Peters y Cols. (9) como patrón de comparación para la dosificación de hierro sérico.
- 3.- El de Rath y Finch (10) como patrón de comparación para la medición de la capacidad de fijación de hierro.

A continuación se describen los métodos empleados.

* Convencionalmente en el curso del trabajo se designan como sueros "normales" los sueros claros, sin lipemia, ictericia o hemólisis.

A.- Método de Schade, Oyama, Heinhart y Miller (8) para determinar hierro sérico.

1.- Procedimiento original.

Fundamento.

Este método comprende el empleo de muestras de suero o plasma, para dosificar el hierro sérico a través de los pasos siguientes:

- 1.- Ajustar el pH por medio de un buffer de fosfatos para lograr que la unión ión férrico-transferrina se rompa de tal manera que sea capaz de combinarse el hierro liberado con un reactivo cromogénico adecuado.
- 2.- Formar un complejo ión ferroso-terpiridina que permita dosificar la cantidad de hierro presente en el suero.

Reactivos.

- 1.- Buffer de fosfatos-Ácido ascórbico.- Se prepara un buffer molar de fosfatos ajustado a un pH de 5.4 a partir de soluciones molares de ácido fosfórico y fosfato diádico libres de hierro. A 100 ml. de esta solución buffer se le agrega 1 gr. de ácido ascórbico; el pH de la solución resultante es de 5.0.
Conservada en el refrigerador se mantiene estable por lo menos una semana.
- 2.- Reactivo de terpiridina al 0.1%.- Se prepara disolviendo 100 mg. de terpiridina en 4 ml. de etanol absoluto y diluyendo con agua a 40 ml. aproximadamente; la suspensión lechosa resultante se aclara con la adición de go-

tas de ácido clorhídrico 0.2 N; lograda una solución clara, se afora a un volumen de 100 ml. El pH de este reactivo es de 4.3.

3.- Reactivos de trabajo.- El reactivo denominado "A" se prepara mezclando 4 partes del reactivo buffer fosfatos-ácido ascórbico con 6 partes de agua. El reactivo "B" se prepara mezclando 4 partes de buffer fosfatos-ácido ascórbico con 2 partes del reactivo de terpiridina y 4 partes de agua. El reactivo "A" se usa para el tubo designado blanco y el reactivo "B" para el tubo problema.

Curva estándar de hierro.

Se prepara una solución madre de hierro que contenga 1 mg./ml. = 1000 µg./ml., disolviendo una sal de hierro en un volumen mínimo de ácido sulfúrico 0.1 N. y diluyendo posteriormente con agua libre de hierro. Se hacen diluciones conteniendo 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 y 2.4 µg./ml. a partir de la solución madre. De tales diluciones se establece una curva estándar hierro-terpiridina bajo las condiciones del problema.

Procedimiento.

Se coloca 0.5 ml. del suero en cada una de dos celdillas de 1 cm. de ancho: a una se le agrega 0.5 ml. del reactivo "A" (tubo blanco) y a la otra, 0.5 ml. del reactivo "B" (tubo problema). El pH final en ambos tubos es aproximadamente de 6.0. Ambos tubos se colocan en baño ma

rfa a 45°C durante 20 minutos; después de este período - se hace la lectura del tubo problema contra el tubo blanco en un espectrofotómetro a 552 m μ . La densidad óptica obtenida, corregida por el blanco de reactivos (0.5 ml. de agua más 0.5 ml. del reactivo "B" leído contra 0.5 ml. de agua más 0.5 ml. del reactivo "A") da la cantidad de hierro presente en cada ml. de suero problema cuando se lee en la curva estándar hierro-terpiridina.

2.- Procedimiento modificado.

La modificación del método original consistió en la utilización de batofenantrolina en substitución de la terpiridina. El uso de este agente cromógeno permite mediciones más exactas de hierro ya que el complejo batofenantrolina-ión ferroso posee un coeficiente de extinción molar mucho mayor que el ferroso-terpiridina, con lo que se logra mayor sensibilidad y exactitud en la dosificación.

Reactivos.

- 1.- Buffer de fosfatos-ácido ascórbico.- Se prepara en - igual forma que para la técnica original.
- 2.- Reactivo de batofenantrolina.- Se prepara una solu - ción al 0.16% en alcohol etílico libre de hierro.
- 3.- Reactivos de trabajo.- El reactivo "A" se prepara mezclando 4 partes de buffer de fosfatos-ácido ascórbico con 6 partes de agua. El reactivo "B" se prepara mezclando 4 partes de buffer de fosfatos-ácido ascórbico con 5.5 de agua y 0.5 de solución de batofenantrolina. Además, se prepara un reactivo "C" compuesto de 4 partes de buffer de fosfatos-ácido ascórbico, 2 partes - de agua, 3.5 de alcohol etílico y 0.5 de reactivo de batofenantrolina y un reactivo "D" hecho substituyendo el 0.5 ml. del reactivo de batofenantrolina usado en el "C" por 0.5 ml. más de alcohol etílico.

Material.

Tubos de ensaye.

Pipetas de 0.2, 1, 4 y 5 ml.

Celdillas de espectrofotómetro Coleman Jr. de 12 x 75 mm.

Papel "parafilm".

Todo el material debe lavarse con ácido nítrico 6 N y enjuagado varias veces con agua bidestilada y después con agua libre de hierro.

Curva estándar de hierro.

Se prepara un estándar de hierro de 0.03 mg./ml. = 3000 μ g./100 ml. a partir de sulfato ferroso amónico en solución de ácido sulfúrico al 0.18%.

La curva de calibración se obtiene tratando igual que al suero problema, a estándares de 60, 120, 180, 240 y 300 μ g./100 ml. hechos a partir de la solución original de 3000 μ g./100 ml. Con los valores de densidad óptica obtenidos al leer los estándares, se traza una curva en la cual se puede obtener directamente la concentración de hierro en μ g./100 ml. ya que ésta es la unidad de concentración habitual para designar a este parámetro en el suero.

La gráfica 1 muestra la curva estándar obtenida con este procedimiento. Cada punto representa el promedio de 4 determinaciones diferentes.

Procedimiento.

Se coloca 1 ml. de suero en cada una de dos celdillas de 12 mm. de ancho: a una se le agrega 1 ml. del reactivo "A" (tubo blanco) y a la otra, 1 ml. del reactivo "B" (tubo problema). El pH final en ambos tubos es aproximadamente de 6.0. Los tubos se colocan en baño maría a 45°C durante 20 minutos; después de este período, se hace la lectura del tubo problema contra el tubo blanco en el espectrofotómetro Coleman Jr. a 552.5 m μ . La densidad óptica obtenida, corregida por los blancos de reactivos (1 ml. de agua más 1 ml. del reactivo "C" leído contra 1 ml. de agua más 1 ml. de reactivo "D") nos da la cantidad de hierro en 100 ml. del suero problema al hacer las lecturas en la curva estándar hierro-batofenantrolina.

*Utilizada en lugar de la de 552 m μ de la técnica original ya que con el espectrofotómetro usado (Coleman Jr. que posee una escala con intervalos de 5 m μ) se facilita, en esta forma, un mejor ajuste de la longitud de onda.

B.- Método de Peters y Cola. (9) para determinar hierro sérico.

Fundamento.

Este método consta de tres pasos fundamentales.

- 1.- Liberar el hierro de las proteínas.
- 2.- Precipitar las proteínas una vez separado el hierro.
- 3.- Formar un complejo colorido ión ferroso-batofenantrolina que permita medir la cantidad de hierro presente en el suero.

Reactivos.

- 1.- Acido clorhídrico 0.2 N en solución acuosa.
- 2.- Acido tioglicólico (ácido 2-mercapto-etanoico) al 80% en solución acuosa.
- 3.- Acido tricloroacético al 30% en solución acuosa.
- 4.- Solución acuosa saturada de acetato de sodio.
- 5.- Solución de batofenantrolina al 0.02% en alcohol isopropílico.

Debe emplearse agua libre de hierro en la preparación de todos los reactivos.

Material.

Tubos de ensaye de 15 x 125 mm.

Pipetas de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 ml.

Agitador de vidrio.

Celdillas del espectrofotómetro Coleman de 19 x 105 mm.

Papel "parafilm".

Todo el material debe lavarse con ácido nítrico 6 N y enjuagarse varias veces con agua bidestilada y después, con agua libre de hierro.

Curva estándar de hierro-batofenantrolina.

La curva de calibración se obtiene preparando a partir de una sal de hierro, estándares de 50, 100, 150, 200, 250 y 300 $\mu\text{g.}/100$ ml. los cuales, procesados en igual forma que el suero problema, nos permite trazar una gráfica de equivalencias para obtener directamente la concentración de hierro en $\mu\text{g.}/100$ ml.

Procedimiento.

- 1.- Se depositan 2 ml. de suero problema en un tubo de 15 x 125 mm.
- 2.- Se agregan 3 ml. del ácido clorhídrico y una gota del ácido tioglicólico; se mezcla y se deja reposar 30 minutos a temperatura ambiente.
- 3.- Se añade 1 ml. del ácido tricloroacético; se mezcla con un agitador de vidrio y se deja reposar 30 minutos a temperatura ambiente, cubriendo el tubo con papel "parafila".
- 4.- Se centrifuga a 2,000 r.p.m. durante un tiempo mínimo de 15 minutos.
- 5.- Se separan 4 ml. del sobrenadante y se depositan en una celdilla del espectrofotómetro Coleman Jr.; se agrega 0.5 ml. del acetato de sodio y 2 ml. de la solución de batofenantrolina y se agita.
- 6.- Se deja desarrollar el color a temperatura ambiente durante 15 minutos.

- 7.- Se lee la densidad óptica en el espectrofotómetro a -
535 mμ. contra un blanco que ha sido preparado usando
2 ml. de agua libre de hierro en lugar de suero problema
ma.
- 8.- Con la lectura obtenida en densidad óptica, se determina
na en la curva de calibración la concentración de hierr
ro del suero problema.

C.- Método de Schade, Oyama, Reinhart y Miller (8) para determinar la capacidad de fijación de hierro.

1.- Procedimiento original.

Fundamento.

Este método consta de la determinación de la transferrina libre a través de los siguientes pasos:

- 1.- Ajustar el pH por medio de un buffer de "tris" de modo que el complejo transferrina-ión férrico permanezca sin disociarse durante el proceso.
- 2.- Agregar un exceso de hierro al suero, en cantidad conocida y suficiente para saturar toda la transferrina libre.
- 3.- Formar un complejo colorido del hierro en exceso (no unido a la transferrina) con la terpiridina para dosificarlo.

La diferencia entre la cantidad de hierro agregada al suero y la encontrada en exceso, es igual a la capacidad latente de fijación de hierro del suero problema.

Reactivos.

- 1.- Buffer molar de "tris".- "Tris" (hidroximetil-amino-metano)-ajustado a pH de 8.5 con ácido clorhídrico 0.01 N.
- 2.- Solución de hierro.- Solución con 25 µg./ml.
- 3.- Reactivo de "elon".- "Elon" (sulfato de para-metil amino-fenol) al 1% en solución de bisulfito de sodio al 3%.

4.- Reactivo de terpiridina.- Se prepara en igual forma - que para la dosificación de hierro sérico de los mis-
mos autores.

Debe emplearse agua libre de hierro para todas las pre-
paraciones de los reactivos.

Material.

Tubos de ensayo.

Pipetas de 0.1, 0.2, 0.4, 1 y 2 ml.

Celdillas del espectrofotómetro Coleman de 12 x 75 mm.

Papel "parafilm".

Todo el material debe lavarse con ácido nítrico 6 N. y en-
juagarse varias veces con agua bidestilada y después, con
agua libre de hierro.

Procedimiento.

En dos celdillas de 1 cm. de ancho se coloca 0.5 ml.
de suero y se le agrega, a cada una de las celdillas, 0.2
ml. del buffer y 0.1 ml. de la solución de hierro. Los dos
tubos se tapan con papel "parafilm" y se colocan en baño -
de maría a 45°C durante 10 minutos para favorecer la forma-
ción del complejo hierro-transferrina. Al final de este pe-
ríodo, a uno de los tubos que se toma como blanco, se le -
agrega 0.1 ml. de agua y 0.1 ml. del reactivo de "elon"; -
al otro tubo problema se le agrega 0.1 ml. del reactivo de
terpiridina y 0.1 ml. del de "elon". Ambos tubos se tapan
y se colocan en baño de maría a 45°C durante 30 minutos; -
después de este período, se lee el tubo problema contra el
tubo control (blanco) a 552 m μ . en el espectrofotómetro. .

La densidad óptica obtenida, corregida por los blancos de reactivo (0.6 ml. de agua, 0.2 ml. de buffer, 0.1 ml. de terpiridina y 0.1 ml. de "elon", leído contra una muestra idéntica en la que se ha substituído la terpiridina por - agua libre de hierro), se lee en la curva del método de hierro sérico de los mismos autores. Los microgramos de - hierro encontrados en exceso se le restan a los microgramos agregados, para obtener los microgramos de hierro por mililitro de suero que es capaz de fijar la transferrina libre presente en el suero.

2.- Procedimiento Modificado.

El método de dosificación de la capacidad de fijación de hierro se modificó, al igual que el de hierro sérico de los mismos autores, substituyendo la terpiridina por la batoftenantrolina. Los motivos son los mismos ya expuestos para la técnica de hierro sérico.

Reactivos.

- 1.- Buffer molar de "tris".- Se prepara en igual forma a la descrita en la técnica original.
- 2.- Solución de hierro.- Se prepara ligeramente más concentrada que en el método original: 30 $\mu\text{g.}/\text{ml.}$, es decir, contiene 3,000 $\mu\text{g.}/100 \text{ ml.}$
- 3.- Reactivo de "elon".- Se prepara en igual forma a la descrita en la técnica original.
- 4.- Reactivo de batoftenantrolina.- Se prepara una solución al 0.16% en etanol libre de hierro.
Debe emplearse agua libre de hierro en todas las preparaciones de los reactivos.

Material.

Tubos de ensaye.

Pipetas de 0.2, 0.4, 1 y 2 ml.

Celdillas de espectrofotómetro Coleman de 12 x 75 mm.

Papel "parafilm".

Todo el material debe lavarse con ácido nítrico 6 N. y enjuagarse varias veces con agua bidestilada y después, con agua libre de hierro.

Procedimiento.

En dos celdillas de 12 mm. de ancho se coloca 1 ml. de suero y se le agrega, a cada una de las celdillas, 0.2 ml. de buffer y 0.15 ml. de la solución de hierro. Los tubos se tapan con el papel "parafilm" y se colocan en baño de maría a 45°C durante 10 minutos para favorecer la formación del complejo hierro-transferrina. Al final de este período, al tubo que se toma como blanco se le agrega 0.35 ml. de "elon" y 0.3 ml. de agua; al tubo problema se le agrega igual cantidad de "elon", 0.1 ml. de la batofenantrolina y 0.2 ml. de agua libre de hierro. Ambos tubos se tapan y se colocan en baño de maría a 45°C durante 30 minutos. Después se hace la lectura espectrofotométrica del tubo problema contra el blanco a 552.5 m μ . La densidad óptica obtenida, corregida por el blanco de reactivos (un tubo que contenga 0.65 ml. de agua más 0.2 ml. de buffer más 0.35 ml. de "elon" más 0.1 ml. del reactivo de batofenantrolina y 0.7 ml. de alcohol etílico leído contra otro tubo que contenga los mismos reactivos pero en el que se substituya el 0.1 ml. de batofenantrolina por 0.1 ml. extra de alcohol etílico) se determina la equivalencia de hierro empleando la curva estándar hierro-batofenantrolina del método modificado para determinar hierro férrico de los mismos autores. Esta concentración se le resta a la de 4.5 μ g./100 ml. adicionados (0.15 ml. contienen 4.5 μ g.) para obtener la capacidad de fijación de hierro libre en el suero.

D.- Método de Rath y Finch (10) para dosificar la capacidad de fijación de hierro en el suero.

Fundamento.

Entre las proteínas del suero se encuentra una beta-globulina llamada transferrina o siderofilina, que tiene la propiedad de unirse a los iones férricos en soluciones neutras o ligeramente alcalinas para formar el complejo hierro-transferrina. La transferrina es de por sí incolora pero, combinada con el hierro, desarrolla un color rosa salmón; consecuentemente, el cambio de color del suero, al añadir sales simples de hierro, puede ser utilizado para medir el contenido sérico de la transferrina no unida al hierro.

En la técnica por describir, una vez determinada la densidad óptica del suero, se comienzan a añadir cantidades conocidas de hierro. Mientras exista transferrina libre, la adición de los iones metálicos provocará la formación del complejo lo que repercutirá en un aumento de la densidad óptica. Cuando toda la transferrina presente esté unida a hierro, la densidad óptica de la muestra no aumentará con nuevas adiciones del metal.

Reactivos.

- 1.- Solución salina al 0.85%.
- 2.- Solución con 20 μ g. de hierro por mililitro.

Debe emplearse agua libre de hierro en la preparación de los reactivos.

Material.

Celdillas del espectrofotómetro Coleman Jr. de 19 x 105 mm.

Pipetas volumétricas de 2 y 5 ml.

Pipetas serológicas de 0.2 ml. graduadas en 0.01 ml.

Procedimiento.

- 1.- En una celdilla se colocan 2.0 ml. de suero problema y 5.0 ml. de solución salina isotónica, se mezclan y se determina la densidad óptica del suero contra un blanco de agua a 520 $m\mu$. de longitud de onda.
- 2.- Se agrega 0.05 ml. de la solución de hierro, se agita y se deja reposar 3 minutos. Se lee nuevamente la densidad óptica.
- 3.- Se repite el paso 2 mientras la densidad óptica siga aumentando después de cada adición de hierro; la prueba se considera terminada cuando la densidad óptica no cambia después de 3 adiciones sucesivas.
- 4.- Cada una de las adiciones de 0.05 ml. (que contienen 1 μ g. de hierro) a 2 ml. de suero equivalen a añadir 50 μ g. a 100 ml. de suero. Consecuentemente, si la densidad se mantenía igual, por ejemplo, después de la cuarta, quinta y sexta adiciones, la capacidad de fijación se consideró de 200 μ g./100 ml. Si lo hacía por ejemplo, después de las adiciones sexta, séptima y octava, la capacidad de fijación se consideró de 300 μ g./100 ml.

RESULTADOS

A.- Dosificación de hierro sérico.

- 1.- En la Tabla 1 se presentan comparativamente las determinaciones de hierro sérico obtenidas por los métodos de Schade y Cols.* (8) y de Peters y Cols. (9) en sueros "normales" de sujetos con sideremia normal, baja o elevada, en sueros ictericos y en sueros lipémicos. En los tres tipos de sueros analizados no se observó diferencia significativa entre los resultados obtenidos con ambos métodos (p mayor de 0.10 por la prueba t de experimentos pareados).
- 2.- En la Tabla 2 se muestran los resultados de las pruebas de recuperación del hierro realizadas por ambos métodos. En ella puede apreciarse que las recuperaciones obtenidas con el método de Schade son aceptables, con una recuperación promedio de (99.9%), al igual que la obtenida con el de Peters y Cols. (104.9%).
- 3.- En la Tabla 3 y la gráfica 2 se muestra el efecto que tiene la presencia de hemoglobina libre sobre la dosificación de hierro sérico por los métodos citados. En ella puede apreciarse que la presencia de concentraciones aún elevadas de pigmento hemático no altera significativamente los resultados de hierro sérico medido por el método de Schade, mientras que sí lo hace en forma creciente, cuando dicho índice se determina por el método de Peters.

* El método de Schade y Cols. (8) empleado en las determinaciones, es el modificado.

Tabla 3

Comparación de los métodos de Jeter y Cole, y Schade y Cole, para dosificar hierro según su suero con diversos carac-
rísticas.

Causa (1)	Cuerpo enfermo (mg/100 ml.)		Diferencia de métodos (ml. 0.1p.0.10)
	Hetero (2)	Isotelo (3)	
A) Hierro "Normal"			
1	25	25	+ 2
2	50	46	+ 16
3	55	53	- 2
4	60	56	+ 8
5	65	58	- 7
6	70	60	+ 8
7	100	110	+ 10
8	136	139	+ 3
9	140	148	+ 8
10	180	183	+ 3
11	220	220	0
12	222	220	- 2
13	255	249	+ 6
14	265	252	- 7
C) Hierro Lipémico			
Diferencia de métodos (t=0.2Nip>0.10)			
1	100	108	+ 8
2	112	118	+ 6
3	130	125	- 5
4	135	130	- 5
5	135	138	+ 3
6	152	145	- 7
7	204	200	- 4

Tabla 1

Comparación de los aditivos de Fators 7 Calo. 7 Estado 7
 Calo. Para identificar siertos adites en osoros con diversos efectos
 rificios.

Caste	Sierto adites:		Diferencia de adites (Val. 0.10)	Diferencia (2)-(1)
	Fators (1)	Calo (2)		
1	25	15		• 5
2	50	64		• 16
3	55	51		• 4
4	60	64		• 6
5	66	70		• 10
6	78	75		- 1
7	85	85		0
8	90	74		- 13
9	92	97		• 7
10	95	100		• 5
11	100	-100		• 5
12	106	104		• 6
13	105	93		- 12
14	102	78		- 7
15	102	112		• 7
16	106	105		- 1
17	107	99		- 8
18	110	117		• 7
19	112	112		0
20	112	115		• 3
21	113	110		- 3
22	113	115		• 2
23	115	112		- 3
24	115	124		• 9
25	117	112		- 5
26	120	120		0
27	120	123		• 3
28	120	126		• 6
29	122	121		- 1
30	122	130		• 8
31	124	129		• 5
32	130	132		• 2
33	135	140		• 5
34	140	123		- 17
35	140	135		- 5
36	140	147		• 7
37	143	147		• 4

18	110	117	7
19	112	112	0
20	112	115	+ 3
21	113	110	- 3
22	113	115	+ 2
23	115	112	- 3
24	115	124	+ 9
25	117	112	- 5
26	120	120	0
27	120	123	+ 3
28	120	126	+ 6
29	122	121	- 1
30	122	139	+ 8
31	124	129	+ 5
32	130	132	+ 2
33	135	140	+ 5
34	140	123	- 17
35	140	135	- 5
36	140	147	+ 7
37	143	147	+ 4
38	145	152	+ 7
39	145	152	+ 7
40	145	169	+ 23
41	147	146	- 1
42	160	160	0
43	165	150	- 15
44	170	175	+ 5
45	175	169	- 6
46	175	175	- 5

B) Sueros ictericos		Diferencia de métodos (t=0.49; p>0.10)	
1	55	56	- 7
2	82	93	+ 8
3	100	110	+ 10
4	136	139	+ 3
5	140	145	+ 8
6	180	183	+ 3
7	200	200	0
8	222	220	- 2
9	255	249	- 6
10	265	255	- 7

C) Sueros lipemicos		Diferencia de métodos (t=0.24; p>0.10)	
1	100	108	+ 8
2	112	118	+ 6
3	130	125	- 5
4	135	130	- 5
5	135	138	+ 3
6	152	145	- 7
7	204	200	- 4

Tabla 2

Estudio de la recuperación del hierro por los métodos de Schade y Cols. y Peters y Cols.

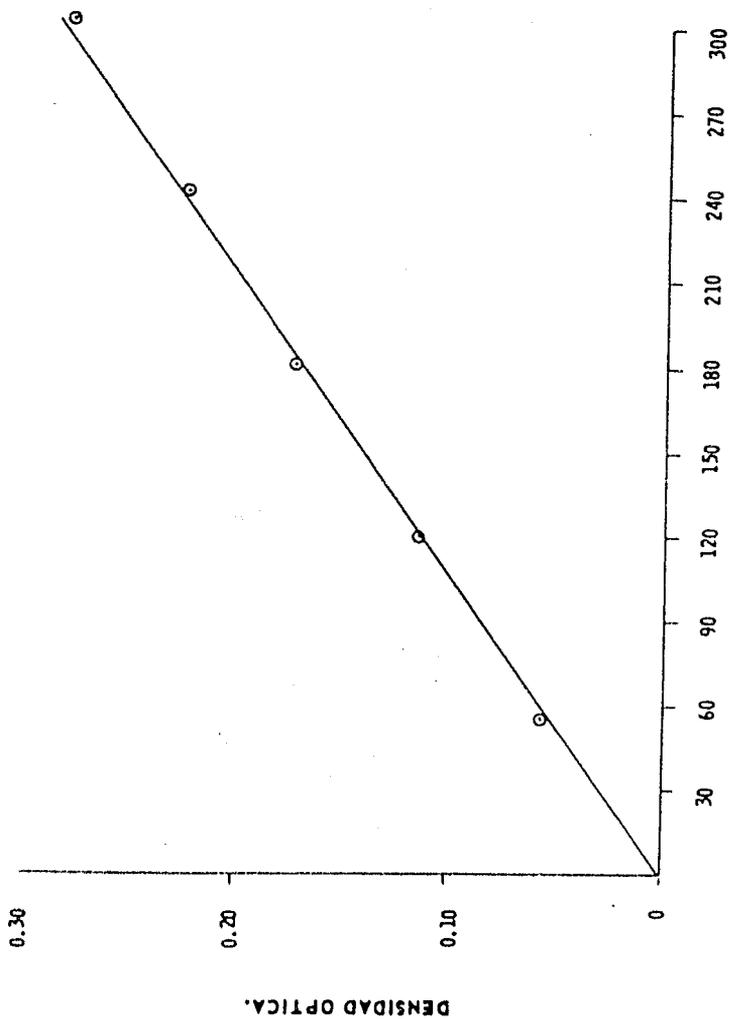
Sueros	Hierro agregado en (µg./100 ml.)	Hierro sérico (µg./100 ml.)		Recuperación en %	
		Peters	Schade	Peters	Schade
A	0	117.5	115	-	-
	75	200	196	110.0	108.6
	150	275	268	105.0	102.0
	225	348	345	102.0	102.2
B	0	125	124	-	-
	75	205	192	106.6	90.6
	150	280	275	103.3	100.6
	225	355	339	102.2	95.5

Tabla 3

Efecto de la concentración de hemoglobina sobre los valores de hierro sérico, medido por los dos métodos utilizados.

Sueros	Concentración de Hb en suero (ga./100 ml.)	Hierro sérico (μ g./100 ml.)		Incremento sobre Hierro sérico original	
		Peters	Schade	Peters	Schade
A	0.000	105	93	-	-
	0.150	115	97	10	4
	0.375	155	94	50	1
	0.750	240	102	135	9
	1.125	359	100	245	7
B	0.000	140	147	-	-
	0.150	150	151	10	4
	0.375	175	157	35	10
	0.750	255	140	115	- 7
	1.125	360	165	220	18

CURVA ESTANDAR DE HIERRO



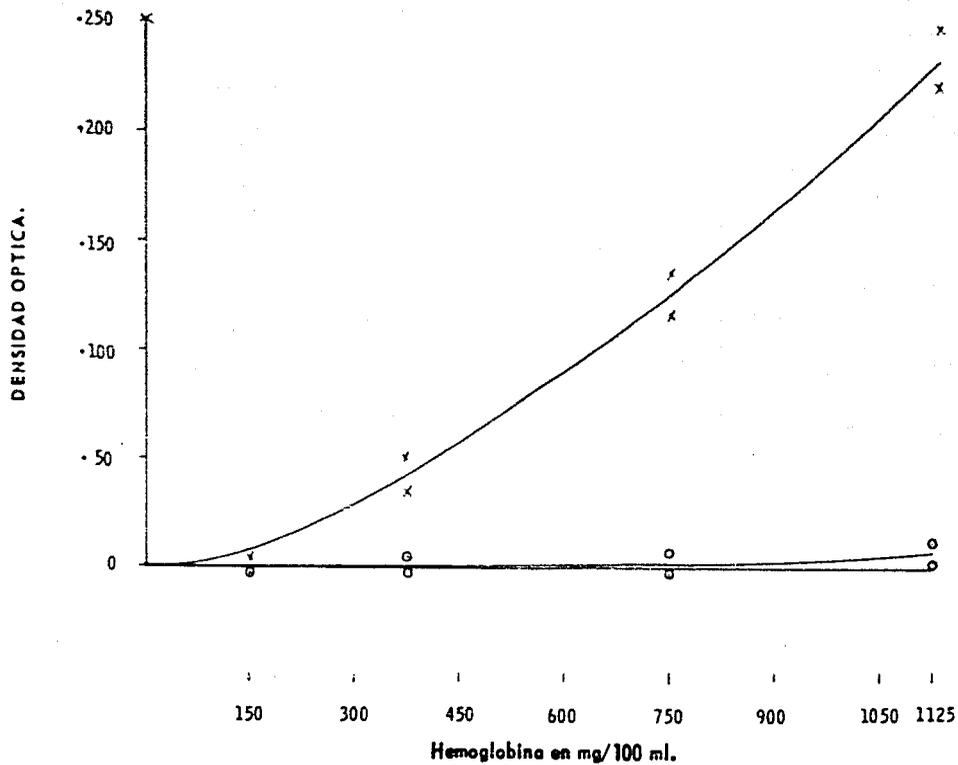
Hierro en (Mg./100 ml.)

GRAFICA I

GRAFICA 2

Efecto de la Presencia de Hemoglobina libre en el suero,
en la dosificación de Hierro.

- x - Método de Peters y Col.
- o - Método de Schode y Col.



B.- Determinación de la capacidad de fijación de hierro.

- 1.- En la Tabla 4 se presentan comparativamente los resultados de las determinaciones de la capacidad de fijación de hierro por los métodos de Schade y Cols. (8) y de Rath y Finch (10), en sueros "normales" obtenidos de sujetos con sideremia normal, alta o baja. No se observó diferencia significativa en los resultados de ambos métodos (p mayor que 0.10 por la prueba t de experimentos pareados).
- 2.- Comprobada la exactitud del método de Schade y Cols. en sueros "normales", se procedió a determinar si dicho método era capaz de medir la capacidad de fijación de hierro en sueros icterícos y envejecidos. A diferencia de los datos obtenidos en sueros frescos "normales", en los sueros icterícos (Tabla 5) y envejecidos (Tabla 6), se obtuvieron diferencias significativas en los resultados de uno y otro método, ya que la capacidad de fijación de hierro por el método de Schade siempre fue mayor que los del método alternativo. Estos datos son sugestivos de que la ictericia y el almacenamiento no afectan los resultados de capacidad de fijación de hierro por el método de Schade y Cols. ya que es conocido que con el de Rath y Finch, los resultados son bajos en los sueros icterícos y decrecen con el tiempo de almacenamiento en todos los sueros.
- 3.- En base a estos resultados preliminares, se realizaron mediciones de la capacidad de fijación de hierro en mezclas de sueros "normales" e icterícos y de "normales" con lipémicos.

Los resultados de la adición de cantidades variables de un suero icterico a un suero "normal" sobre la determinación de la capacidad de fijación de hierro por el método en estudio, se muestra en la Tabla 7. Esta pone de manifiesto que la presencia hasta de 22.88 mg. de bilirrubina directa por 100 ml. no influyó en la exactitud de la determinación. De igual manera, como puede apreciarse en la Tabla 8, la lipemia tampoco alteró la medición de la capacidad de fijación de hierro por el método de Schade y Cols.

4.- En cambio, la adición de hemoglobina a un suero "normal" sí afectó la habilidad del método en estudio como puede observarse en la Tabla 9. En ambas experiencias hubo, sorpresivamente, un aumento gradual en el dato de la capacidad de fijación de hierro a medida que aumentó la concentración de hemoglobina del suero.

Tabla 4

Comparación entre los valores de capacidad libre de fijación de hierro obtenidos por los métodos de Rath y Finch - (10) y Schade y Cols. (8) modificado, en sueros normales.

Casos	Capacidad de fijación de hierro (Mg./100 ml.)		Diferencia (2)-(1)
	Rath y Finch (1)	Schade y Cols. (2)	
Sueros "Normales" Diferencia de métodos ($t=1.04$; $p>0.10$)			
1	100	98	- 2
2	150	141	- 9
3	150	150	0
4	150	150	0
5	150	151	+ 1
6	150	159	+ 9
7	200	175	- 25
8	200	198	- 2
9	200	207	+ 7
10	200	210	+ 10
11	200	215	+ 15
12	200	240	- 40
13	250	240	- 10
14	250	245	- 5
15	250	250	0
16	250	253	+ 3
17	250	255	+ 5
18	300	325	+ 25

Tabla 5

Resultados comparativos de los métodos de Rath y Finch y Schade y Cols. modificado, para dosificar la capacidad de fijación de hierro en sueros ictericos.

Casos	Bilirrubina directa* (mg./100 ml.)	Capacidad de fijación de hierro (µg./100 ml.)		Diferencia (2)-(1)
		Rath y Finch (1)	Schade y Cols. (2)	
1	0.14	250	310	+ 60
2	0.28	150	280	+ 130
3	0.40	200	310	+ 110
4	1.30	0	250	+ 250
5	1.25	0	320	+ 320
6	1.48	0	100	+ 100

* Los sueros 5 y 6 tenían además bilirrubina indirecta: 3.2 y 3.1 mg. por 100 ml. respectivamente.

Tabla 5

Resultados comparativos de los métodos de Rath y Finch y Schade y Cols. modificado, para dosificar la capacidad de fijación de hierro en sueros ictéricos.

Casos	Bilirrubina directa* (mg./100 ml.)	Capacidad de fijación de hierro (µg./100 ml.)		Diferencia (2)-(1)
		Rath y Finch (1)	Schade y Cols. (2)	
1	0.14	250	310	+ 60
2	0.28	150	280	+ 130
3	0.40	200	310	+ 110
4	1.30	0	250	+ 250
5	1.25	0	320	+ 320
6	1.48	0	100	+ 100

* Los sueros 5 y 6 tenían además bilirrubina indirecta: 3.2 y 3.1 mg. por 100 ml. respectivamente.

Tabla 6

Resultados comparativos de los métodos de Rath y Finch y Schade y Cols. modificado, para dosificar la capacidad de fijación de hierro en sueros almacenados a -4°C.

Casos	Tiempo de almacenamiento (días)	Capacidad de fijación de hierro (µg./100 ml.)		Diferencia (2)-(1)
		Rath y Finch (1)	Schade y Cols. (2)	
1	2	100	150	+ 50
2	3	150	220	+ 70
3	4	200	345	+ 145
4	6	150	202	+ 52
5	6	150	240	+ 90
6	8	200	325	+ 125
7	10	200	350	+ 150

Tabla 7

Efecto de la ictericia sobre los valores de capacidad de fijación de hierro por el método modificado de Schade y Cols. en mezclas de sueros "normales" e icterícos.

Pruebas	Proporción de suero		Concentración de bilirrubina en la mezcla (mg./100 ml.)	Capacidad de fijación de hierro (mg./100 ml.)		Diferencia (2)-(1)
	normal (%)	ictérico (%)		Esperado (1)	Observado (2)	
A	100.0	0.0	-	-	215	-
	95.2	4.8	1.92	210	213	+ 3
	90.9	9.1	3.64	206	208	+ 2
	86.9	13.1	5.24	202	205	+ 3
	83.3	16.7	6.68	197	201	+ 4
	0.0	100.0	40.00	-	115	-
B	100.0	0.0	-	-	230	-
	90.9	9.1	7.28	218	218	0
	83.3	16.7	13.36	208	210	+ 2
	76.9	23.1	18.48	200	203	+ 3
	71.4	28.6	22.88	193	190	- 3
	0.0	100.0	80.0	-	100	-

Tabla 8

Efecto de la lipemia sobre los valores de capacidad de fijación de hierro por el método modificado de Schade y Cols. en mezclas de sueros "normales" y lipémicos.

Pruebas	Proporción de suero		Capacidad de fijación de hierro (µg./100 ml.)		Diferencia (2)-(1)
	no lipémico (%)	lipémico (%)	Esperado (1)	Observado (2)	
A	100	0	-	245	-
	75	25	221	240	+ 19
	50	50	197	200	+ 3
	25	75	174	182	+ 8
	0	100	-	150	-
B	100	0	-	245	-
	75	25	234	230	- 4
	50	50	222	205	- 17
	25	75	211	183	- 28
	0	100	-	200	-

Tabla 9

Efecto de hemolisis sobre los valores de capacidad de fijación de hierro por el método modificado de Schade y Cols. en mezclas de sueros "Normales" y hemolizados.

Pruebas	Proporción de suero		Concentración de hemoglobina* en la mezcla (gm./100 ml.)	Capacidad de fijación de hierro (µg./100 ml.)	Diferencia con la capacidad de fijación de suero sin Hb.
	normal (%)	hemolizado (%)			
A	100	0.0	-	205	-
	98.0	2.0	0.160	216	+ 11
	96.1	3.9	0.312	220	+ 15
	92.6	7.4	0.592	240	+ 35
	90.9	9.1	0.728	243	+ 38
B	100	0.0	-	172	-
	96.1	3.9	0.312	215	+ 43
	95.2	4.8	0.384	275	+103
	92.6	7.4	0.592	317	+145
	86.2	13.8	1.100	345	+173

* Calculada con la concentración de hemoglobina del suero hemolizado: 8.0 gm. x 100 ml. para ambas experiencias.

COMENTARIO Y CONCLUSIONES

En conjunto, los resultados del presente trabajo confirman las observaciones de Schade y Cols. relativas a la simplicidad, rapidez y exactitud de los métodos desarrollados por dichos autores para determinar hierro sérico y capacidad de fijación de hierro por el suero. En relación a la simplicidad y a la rapidez, puede decirse que basta una hora para poder valorar ambas determinaciones en diez muestras diferentes, lo que contrasta con las tres horas requeridas al utilizar los procedimientos alternativos simples y más aún, con las 24 a 48 horas que exigen los procedimientos de digestión.

La exactitud del método de Schade y Cols. para dosificar hierro sérico, puede ser comprobada de diferentes maneras:

1.- Por la dosificación de hierro sérico.- Comparando el método en estudio con el de Peters y Cols. En 46 sueros "normales", 10 sueros ictericos y 7 lipémicos, los resultados fueron estadísticamente similares en los tres tipos de suero (p mayor de 0.10 por la prueba t de experimentos pareados) (Tabla 1).

2.- Por estudio de recuperación de hierro.- Este tipo de estudio se realizó en dos ocasiones, y en ambas la recuperación obtenida por el método de Schade fue excelente en el rango de 115 a 339 $\mu\text{g.}/100$ ml. (Tabla 2).

3.- Por el estudio del efecto de la hemólisis sobre los resultados.- Es conocido que tanto los métodos de digestión como aquellos en que la proteína se precipita para hacer la dosificación de hierro, la presencia de hemólisis aún ligera, afecta notablemente los resultados porque durante el proceso de digestión o de libera-

ción del hierro sérico previo al precipitado de la proteína, se libera también parte o todo el hierro hemoglobínico. Por ello, todos los métodos previamente utilizados incluyendo el de Peters y Cols. daban resultados de hierro sérico artificialmente elevados en sueros hemolizados (Tabla 3). Este efecto se observa con mayor claridad en la gráfica 2 en la que con el método de Peters, hay un ascenso en el valor de hierro sérico a medida que aumenta la cantidad de hemoglobina en dicho suero; por el contrario, con el método de Schade y Cols., los resultados de hierro sérico son similares e irrelevantes de la cantidad de hemoglobina presente.

En relación al método de Schade y Cols. para medir la capacidad de fijación de hierro, se realizaron los siguientes estudios con objeto de determinar la exactitud en sueros con diversas características.

1.- Primeramente se estableció la comparatividad del método en estudio con el de Rath y Finch en sueros "normales"; los resultados con ambos métodos fueron similares (p mayor de 0.10 por la prueba t de experimentos pareados) (Tabla 4). En cambio, cuando se trató de sueros ictericos o envejecidos, los resultados obtenidos con el método de Schade fueron constantemente mayores que con el otro método (Tablas 5 y 6). Esto nos sugirió que el método en estudio no era afectado por estos factores, ya que es sabido que los resultados del de Rath y Finch se alteran por la presencia de ictericia, lipemia, hemólisis y envejecimiento, obteniéndose resultados falsamente bajos.

2.- La presunción de que la ictericia no afecta los resultados en el método de Schade, se comprobó en mezclas de sueros "nor-

males" con sueros ictericos en las que habia de 1.92 a 22.88 mg. - de bilirrubina directa por 100 ml. En todos los casos los resultados obtenidos coincidieron con el teóricamente esperado (Tabla 7).

3.- Un experimento similar realizado en mezclas de sueros - "normales" con sueros lipémicos, igualmente permitió comprobar que, a diferencia de lo que ocurre en el método de Bath y Finch, el de Schade y Cols. no da resultados erróneos en sueros lipémicos (Tabla 8).

4.- Finalmente, se investigó la exactitud en sueros hemolizados. Sorprendentemente se observó que en este caso, con el método en estudio se obtienen resultados erróneamente altos (Tabla 9) y - no bajos como sucede en el de Bath y Finch.

Por todo lo anterior, resulta obvio que, salvo para la - determinación de la capacidad de fijación de hierro en sueros hemolizados, los métodos de Schade y Cols. tienen grandes ventajas sobre otros, derivadas de su simplicidad, rapidez y exactitud. Ello los hace recomendables para ser usados no solo en los laboratorios clínicos, sino también para trabajos de investigación.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Báez-Villasenor, J.: Hematología Clínica. Ediciones del Hospital de Nutrición. Primera edición. México, 1961, pp.89-100.
- 2.- Wintrobe, M.M.: Hematología Clínica, Ediciones internacionales, traducción de la 2ª edición. México, 1948: pp.60-62.
- 3.- Heilmeyer, L.: The sidero--achrestic anaemias. Germ. Med. Monthly, 4: 403, 1959.
- 4.- Eizza, F. & Block, M.: Interrelationship of the serum iron-binding capacity and tissue iron. Acta Haemat. 25:1, 1961.
- 5.- Wintrobe, M.M.: Clinical Hematology. Lea & Febiger, 5ª ed. Philadelphia, 1960. pp. 145-150.
- 6.- Bariéty, M. & Gajdes, A.: Etude comparative du métabolisme du fer et de l'anémie au cours des cancers et des états infectieux. Le sang, 31: 749, 1960.
- 7.- Seligson, D.: Serum iron and transaminase in teh differential diagnosis of jaundice. Med. Clin. North. Am., W.B. Saunders Co., Philadelphia, Noviembre, 1957, pp.1631-1637.
- 8.- Peters, T., Giovanello, T.J., Apt, L. & Ross, J. F.: A simple improved method for the determination of serum iron. J. Lab. & Clin. Med., 48: 280, 1956.
- 9.- Schade, A., Oyama, J., Reinhart, W. & Miller, J.: Bound iron and unsaturated iron-binding capacity of serum: Rapid and reliable quantitative determination. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 87: 443, 1957.
- 10.- Rath, C. E. & Finch, C.A.: Serum iron transport. Measurement of iron-binding capacity of serum in man. J. Clin. Invest., 28: 79, 1949.
- 11.- Durazo G., F.: Determinaciones de hierro sérico. Gaceta Med. Mex., 10: 99, 1960.