

Laboratorio de Fisiología Animal
Facultad de Ciencias.
Universidad de Barcelona

Efecto de la Amberlita y del CO_3Mg en los complejos conalbúmina-hierro y transferrina-hierro *

por

J. Balasch y J. Planas

(Recibido para publicar el 29 de abril de 1968)

Es conocida la propiedad del CO_3Mg de absorber ciertos iones entre ellos el hierro. Ello ha servido a ciertos autores para incluir dicho compuesto en los métodos para la determinación de la capacidad total de fijación del hierro por el suero. Seguramente ha sido el método propuesto por RAMSAY (8) uno de los primeros en emplearlo y el que ha gozado de una más amplia difusión por su sencillez y por la bondad de sus resultados. Otros autores (1, 9, 10, 12) han adoptado también el CO_3Mg como elemento adsorbente encargado de la eliminación del hierro excedente en la valoración del contenido en transferrina de un suero (capacidad total de fijación del suero).

En nuestros estudios sobre el transporte del hierro sérico en aves y mamíferos (4, 5, 6, 7) venimos aplicando dicho método desde hace unos 10 años y hemos podido apreciar la bondad del mismo y nos ha permitido descubrir un hecho diferencial en el transporte del hierro sérico en las aves entre los machos y las hembras, que ha sido tratado ampliamente en varias especies.

Nuestra hipótesis de trabajo establece la coexistencia en el suero de las aves de dos sistemas de transporte del hierro: la transferrina y la conalbúmina. Ciertos resultados nos han hecho suponer en una distinta estabilidad de los complejos transferrina-hierro y conalbúmina-hierro frente al carbonato magnésico. Ello nos ha sugerido la conveniencia de estudiar el comportamiento de estas dos proteínas, en forma pura, aislada o conjuntamente, ante la acción del CO_3Mg .

Por otra parte, hemos creído conveniente comparar dicho efecto con los resultados obtenidos con una resina de intercambio iónico, las cuales presentan un mecanismo de captación del Fe distinto al del carbonato, y han sido utilizadas por diversos autores (2, 11) en estudios sobre estos problemas.

* Trabajo realizado con una Ayuda del Fomento de la Investigación en la Universidad (Ministerio de Educación y Ciencia).

Material y métodos

La conalbúmina utilizada ha sido suministrada por la Sigma Chemical Co. (San Luis, Miss.), obtenida a partir de clara de huevo de gallina. Una de las muestras es de pureza del 70 % (Conalbumin Crude IV) y la otra de pureza del 98 % (Conalbumin I).

La transferrina empleada es de origen humano y ha sido suministrada por la firma Beringwerk (Marburg, Alemania); su forma es cristalina y su pureza del 100 %.

En ambas proteínas se han preparado las distintas soluciones con ClNa al 0.9 %.

El método seguido en el presente trabajo constituye una adaptación del propuesto por BOTHWELL y col. (2) para la determinación de la capacidad latente de fijación del hierro en el suero con empleo de Fe-59.

El hierro radiactivo recibido se halla en forma de solución de citrato férrico y con él se contamina una solución madre de citrato amónico férrico perfectamente valorada por un método fotocolorimétrico (α - α' -dipiridilo). La solución final es de 2.450 μ g. Fe/100 ml y su radiactividad es de 1,63 μ c/ml. La solución utilizada contiene 5 μ g Fe/0,2 ml.

El procedimiento seguido es prácticamente igual al indicado por BOTHWELL y colaboradores (2), pero sustituyendo la amberlita en ciertos experimentos por el carbonato magnésico. Los cálculos se realizan como señalan dichos autores a partir del número de cuentas obtenido con 4 ml del problema y 4 ml de un standard preparado con 6 ml de agua y 0,2 ml de la solución de hierro marcado con Fe-59.

Se han determinado en 6 ejemplares de gallina y en cuatro especies de mamíferos (vaca, cerdo, cordero, caballo) la capacidad latente de fijación del hierro por el suero, según el método de BOTHWELL y colaboradores (2) en presencia de 400 mg de amberlita IRA-401, así como después de tratamiento previo con 100, 250 y 400 miligramos de CO_3Mg .

El carbonato magnésico empleado procede de tres firmas (Merck, Schuchart y Probus) no habiéndose apreciado diferencias entre ellos.

El conteo se ha realizado con un equipo Philips dispuesto con una sonda de centelleo y un contador electrónico PW 4038. En todo momento se ha procurado que el standard diera siempre alrededor de unas 10.000 cuentas por minuto.

Resultados

1. *Efecto de la amberlita IRA-401 (400 mg) y el carbonato magnésico (150 miligramos) en la valoración de la capacidad de fijación de distintas concentraciones de conalbúmina.* Las concentraciones de conalbúmina ensayada han sido de 100, 200, 300, 400, 600 y 800 mg %. Los valores medios correspondientes a seis experi-

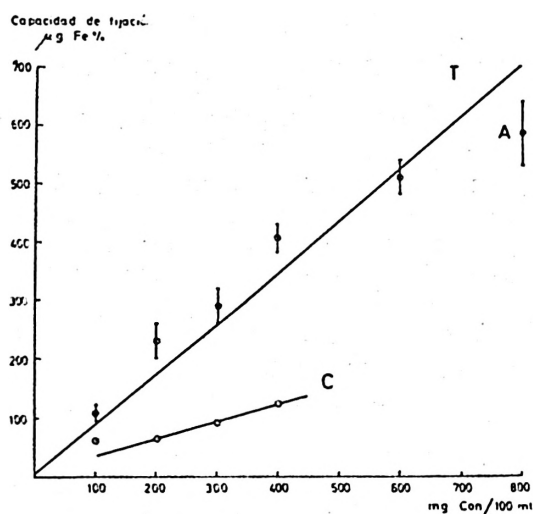


FIG. 1. Valores de capacidad de fijación obtenidos con el empleo de amberlita (A) (400 mg) frente a la recta teórica (T) trazada de acuerdo con su capacidad de fijación (1 mg conalbúmina/1,25 μ g Fe) y a su pureza (70 %). Efecto del CO_3Mg (C) (150 mg) en la determinación de la capacidad de fijación del hierro de soluciones de conalbúmina. Valores medios de seis experimentos.

mentos distintos pueden apreciarse en la figura 1, en donde se señala la recta de valores teóricos al considerar que cada miligramo de proteína captan $1,25 \mu\text{g}$ de hierro y la pureza de dicho producto es del 70 %.

2. *Efecto de la amberlita IRA-401 (400 mg) y el carbonato magnésico (150 miligramos) en la valoración de la capacidad de fijación de distintas concentraciones de transferrina.* Las concentraciones de transferrina empleadas han sido de 100, 200, 300 y 400 mg %. No se han ensayado concentraciones superiores como en el caso de la conalbumina, pues esta proteína es de una pureza del 100 %. Los datos consignados en la figura 2 corresponden a los valores medios de cuatro experimentos e igualmente se indica la recta teórica que corresponde a la transferrina.

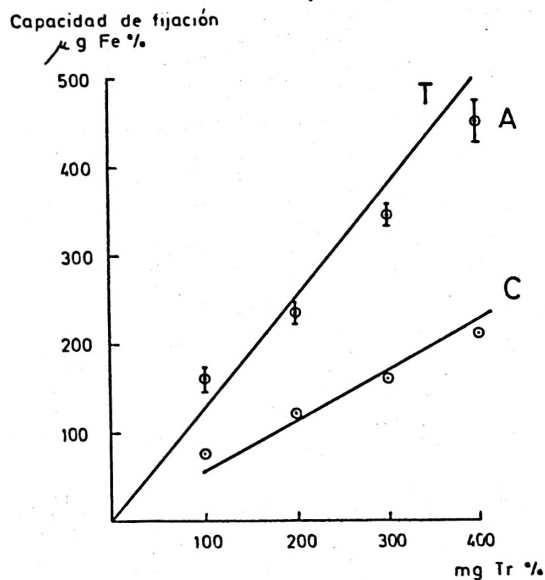


FIG. 2. Efecto de la amberlita (400 mg), A, y del carbonato magnésico (150 mg), C, sobre los valores de capacidad de fijación del hierro por distintas concentraciones de transferrina. La recta teórica, T, se ha construido teniendo en cuenta la relación 1 mg transferrina/ $1,25 \mu\text{g}$ Fe, y una pureza del 100 %.

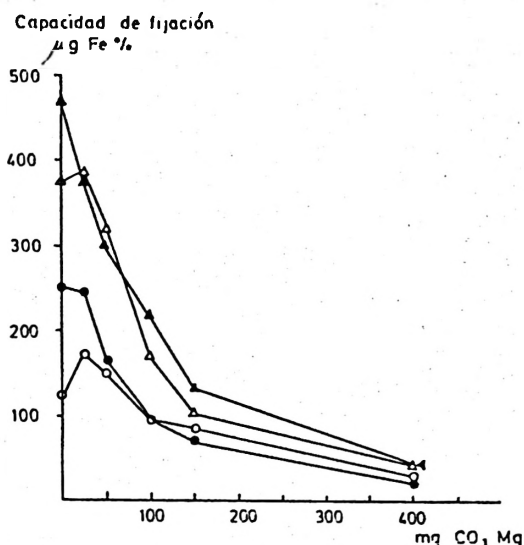


FIG. 3. Efectos de distintas concentraciones de CO_2Mg sobre varias soluciones de conalbumina (pureza 98 %) a distintas concentraciones.

Concentraciones: ○ 100 mg %
● 200 »
△ 300 »
▲ 375 »

TABLA I

Efecto de la Amberlita IRA-401 (400 mg) y del carbonato magnésico (150 mg) en la determinación de las capacidades de fijación de soluciones mixtas de transferrina (Tr) y de conalbumina (Co) (Crude IV, pureza del 70 %).

Fracción Conalbumina- Transferrina	Nº Experi.	Capacidades de fijación en $100 \mu\text{g Fe}/100 \mu\text{g}$		
		Teóricas	Amberlita	Carbonato magnésico
100 mg Tr % - 100 mg Co %	4	212	194 ± 5	96 ± 2
100 mg Tr % - 200 mg Co %	4	320	250 ± 4	121 ± 4
100 mg Tr % - 300 mg Co %	4	397	314 ± 7	151 ± 13
100 mg Co % - 100 mg Tr %	4	212	212 ± 4	95 ± 2
100 mg Co % - 150 mg Tr %	4	275	258 ± 5	107 ± 4
100 mg Co % - 200 mg Tr %	4	337	310 ± 9	132 ± 6

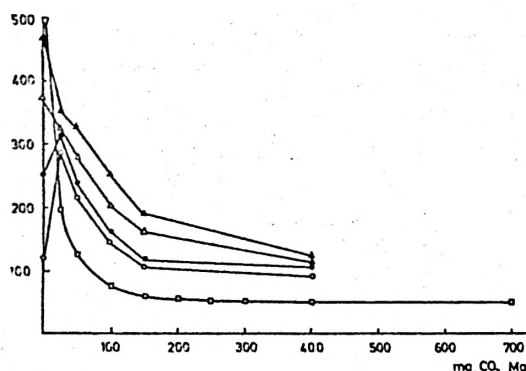


FIG. 4. Variación de la capacidad de fijación de distintas concentraciones de transferrina y la influencia de la cantidad de CO_3Mg empleada en determinación. Inclusion de la curva de absorción del Fe-59 por el carbonato en ausencia de proteína.

Concentraciones: ○ 100 mg %
● 200 »
△ 300 »
▲ 375 »
□ sin proteína

3. *Efecto de la amberlina (400 mg) y del carbonato magnésico (150 mg) en mezclas de conalbumina y transferrina.* En la tabla I se aprecia el efecto de la amberlita y el carbonato magnésico en disoluciones de ambas proteínas. Los datos han sido obtenidos a partir de cuatro experiencias separadas. El carbonato adsorbe del 50 al 60 % del hierro fijado, sea cual fuese la proporción entre estas proteínas.

4. *Efecto de distintas concentraciones de carbonato magnésico en soluciones de conalbumina y transferrina.* Los experimentos con conalbumina han sido realizados en esta ocasión con un producto cristalizado de pureza del 98 % (conalbumina I, Sigma), y las concentraciones empleadas son de 100, 200, 300 y 375 mg por ciento. Los resultados quedan expresados en la figura 3. Las concentraciones de carbonato magnésico empleadas han sido de 25, 50, 100, 150 y 400 mg.

La transferrina ha sido ensayada a las mismas concentraciones que la conalbumina y frente también a las concentraciones de CO_3Mg ya indicadas. Los resultados de cuatro experimentos pueden apreciarse en la figura 4, en donde se incluye la curva de adsorción del hierro por el carbonato en una solución sin la presencia de transferrina.

5. *Efecto de distintas concentraciones al CO_3Mg sobre los valores de la capacidad latente de fijación en el suero.* En la figura 5 pueden observarse la disminución de los valores de fijación frente a las concentraciones crecientes de CO_3Mg . Los valores expuestos son el promedio de dos

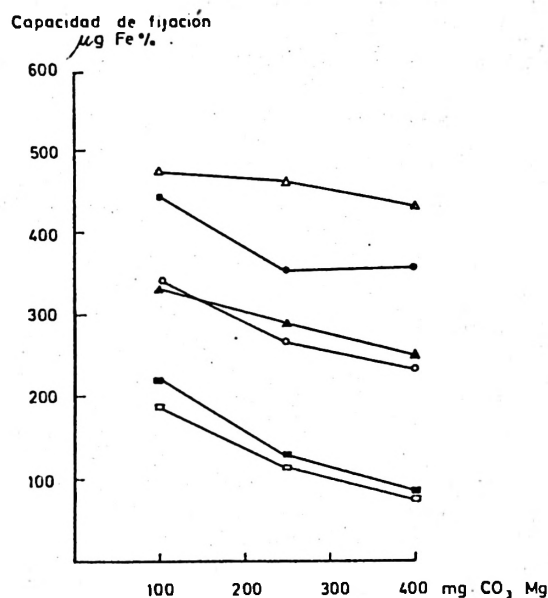


FIG. 5. Influencia del CO_3Mg en la valoración con Fe-59 de la concentración de transferrina (capacidad latente de fijación) en el suero de distintos animales; valores medios de dos ejemplares en los mamíferos y tres en las aves.

□ Gallina
■ Pollo
○ Cordero
● Vaca
△ Cerdo
▲ Caballo

TABLA II

Efecto de concentraciones crecientes de CO_3Mg sobre la capacidad de fijación del hierro en sueros de aves y mamíferos, y en soluciones aisladas de transferrina y conalbúmina. El efecto se expresa en porcentajes de disminución respecto del valor de la capacidad total de fijación (CTF).

Muestra	Nº	CTF µg Fe/100 ml	Concentraciones de CO_3Mg (mg)		
			100	250	400
<u>Sueros</u>					
Cerdo	2	600	20,7	23,6	26,8
Vaca	2	440	0	20,0	13,0
Cordero	2	475	30,0	44,0	51,9
Caballo	2	335	1,3	15,0	31,0
Gallina	3	312	40,5	64,0	76,0
Pollo	3	175	—	20,6	53,0
<u>Soluciones</u>					
Transferrina	4	467	47,0	65,0	73,0
"	4	375	46,5	62,5	69,7
"	4	250	36,0	56,0	58,0
"	4	125	—	19,9	26,0
Conalbumina	4	469	53,0	74,5	90,5
"	4	375	54,6	74,5	89,5
"	4	250	62,0	74,0	88,0
"	4	125	23,9	60,0	84,0

ejemplares en los mamíferos y de tres ejemplares en las aves.

En la tabla II se incluyen los valores de capacidad total de fijación del suero obtenidos según el método de RAMSAY (8) juntamente con los porcentajes de disminución de los valores de la capacidad latente referidos a la capacidad total de fijación.

Discusión

A partir de nuestros experimentos en soluciones de transferrina y de conalbúmina resulta evidente que el carbonato magnésico es capaz de extraer el hierro unido en los complejos transferrina-Fe y conalbúmina-Fe, manteniendo una relación respecto a la concentración de esta sustancia y a la riqueza en proteínas de la solución.

Por el contrario, la resina de intercambio iónico, tipo amberlita (BDH) IRA-

401, recomendada por BOTHWELL y col. (2) y por otros autores en los métodos de determinación de las capacidades de saturación de hierro por el del suero, no muestra tal efecto. La valoración de la concentración de estas dos proteínas por la medida de sus capacidades de fijación de hierro empleando dicha resina, muestra valores que son coincidentes con los datos teóricos (figs. 1 y 2).

Sin embargo, la valoración de las mismas soluciones utilizando 150 mg de carbonato magnésico en lugar de los 400 mg de resina indicada por BOTHWELL y col. (2) produce un descenso del 50-60% en las determinaciones.

El efecto del carbonato magnésico aumenta con su concentración y se muestra también más intenso cuanto más concentrada está la proteína (figs. 3 y 4; tabla II). Igualmente queda patente como su influencia es más marcada sobre las soluciones de conalbúmina que sobre las de transferrina.

La efectividad del carbonato magnésico en la captación del hierro se muestra en la figura 4. La aproximación asintótica al eje de ordenadas, manteniendo una diferencia con él, debe atribuirse al propio método con empleo de Fe-59, y prácticamente debe considerarse que la adsorción a partir de los 200 mg de CO_3Mg es del 100 por ciento.

Dada la diferencia observada entre la conalbúmina y la transferrina, frente al carbonato magnésico, ha sido estudiado su efecto sobre soluciones compuestas por ambas proteínas, en concentraciones variables de una de ellas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla I, y no señalan ningún comportamiento diferencial al hallado en las soluciones aisladas.

Por otra parte, sin embargo, la influencia del CO_3Mg en la valoración de la capacidad de fijación de la transferrina en el suero de los animales no se muestra tan intensa como en soluciones aisladas de esta proteína (fig. 5). Hemos ensayado varios sueros de mamíferos y de gallinas,

analizando la concentración de transferrina circulante no saturada, valor conocido también como capacidad latente de fijación, en presencia de tres concentraciones distintas de CO_3Mg (100, 250 y 400 mg) y se ha comprobado cómo su efecto es muy inferior al apreciado en las soluciones aisladas (tabla II). En los sueros y en las soluciones, se expresan las concentraciones de transferrina y conalbúmina por sus capacidades totales de fijación del hierro a fin de poder comparar los efectos en las condiciones más próximas de concentración de proteína y de carbonato.

En la tabla II queda patente el diferente comportamiento entre los sueros y las soluciones aisladas de conalbúmina y transferrina. El efecto del CO_3Mg en idénticas concentraciones, es claramente superior en las soluciones que en los sueros, y siendo los porcentajes comparativos pues hacen referencia a las capacidades totales de fijación de dichas proteínas. Por el momento, no hallamos explicación a este hecho diferencial.

Es interesante hacer notar cómo en el suero de las gallinas existe una mayor concentración de conalbúmina que en los pollos (3) y cómo el efecto del carbonato se muestra más activo en aquéllas que en éstos.

A la luz de los resultados obtenidos parecen evidentes las siguientes conclusiones: 1.º Es patente un comportamiento distinto entre la resina, amberlita IRA-401 y del carbonato magnésico en la captación del hierro excedente en las valoraciones de las capacidades latentes de fijación. La amberlita elimina solamente dicho hierro libre, sin afectar al hierro unido a la proteína. 2.º El CO_3Mg es capaz además de captar parcialmente el hierro fijado en el complejo transferrina-hierro y conalbúmina-hierro, en soluciones puras. 3.º En el suero también es evidente dicha facultad del carbonato pero los porcentajes son mucho más inferiores. 4.º El comportamiento del CO_3Mg respecto a las dos proteínas es diferente, mostrándose en

complejo conalbúmina-hierro más lábil a su acción.

Estos hechos apoyan las observaciones ya indicadas en estudios anteriores sobre el transporte del hierro en el suero de las aves (5, 7), en donde la presencia conjunta de transferrina y conalbúmina es la causa, seguramente, del comportamiento especial que muestran los sueros, respecto a lo que acontece en los mamíferos, aplicando los mismos métodos.

Resumen

Ha sido analizado comparativamente el comportamiento de soluciones de los complejos de conalbúmina — hierro y transferrina — hierro frente a una resina de intercambio iónico (Amberlita IRA-401) y al carbonato magnésico en polvo.

Se ha comprobado que la Amberlita solamente absorbe el hierro excedente sin captar al unido al complejo, mientras que el CO_3Mg es capaz de sustraer hierro de dichos complejos, mostrando una relación respecto a la concentración del carbonato, y al contenido en la proteína. El complejo conalbúmina-hierro se muestra más débil a la acción del carbonato. Los ensayos realizados con sueros de mamíferos y de aves (pollos y gallinas) muestran que el efecto del CO_3Mg es también evidente, pero los porcentajes de sustracción son muy inferiores.

Summary

Effect of Amberlite and MgCO_3 on Iron-Conalbumin and Iron-Transferrin Complexes

The effects of MgCO_3 and of Amberlite IRA-401 on the iron-transferrin and iron-conalbumin complexes have been analysed. These complexes have been prepared from samples of pure proteins.

Similarly studies have been undertaken to determine the effect of those materials on the valuation of the unbinding iron capacity (UIBC) of sera from various mammiferous and birds. The method

followed was an adaptation of the one used by Botwell and col. (2).

The obtained results have demonstrated differences between the action of amberlite and carbonate. The amberlite only eliminates the excess free iron and the UIBC values obtained in its utilization were in dose approximation to the theoretical ones calculated for both the proteins. On the contrary, the $MgCO_3$ is not only capable to remove the surplus iron, but also a part of the fixed iron from the iron-transferrin and the iron-conalbumin complexes (fig. 1 and 2). A relation of the stated effect to the concentration of carbonate and of the protein has been demonstrated (fig. 3 and 4). The iron is more separable by the carbonate from conalbumin than from transferrin-complexes.

The assays carried out with serum from mammiferous and birds (chickens and hens) showed the described effect of $MgCO_3$ but with inferior percentages of subtraction capacity (table II).

Bibliografía

1. BLIN, CL.: *Bull. Soc. Pharm. Nancy*, 53, 20, 1962.
2. BOTHWELL, T. H., JACOBS, P., y KAMENNER, R.: *S. Afr. J. med. Sci.*, 24, 93, 1959.
3. MARTÍN-MATEO, M. C., y PLANAS, J.: *R. esp. Fistol.*, 21, 1, 1965.
4. PLANAS, J., y CASTRO, S.: *Nature*, 187, 1126, 1960.
5. PLANAS, J., y CASTRO, S., y RECIO, J. M.: *Nature*, 189, 668, 1961.
6. PLANAS, J.: *Nature*, 197, 186, 1963.
7. PLANAS, J.: *Nature*, 215, 289, 1967.
8. RAMSAY, W. N. M.: *Clin. Chim. Acta*, 2, 221, 1957.
9. SCARLATA, R. W., y MOORE, E. W.: *Clin. Chem.*, 8, 360, 1962.
10. SCHAPIRA, F.: *Rev. Franç. Études Clin. et Biol.*, 7, 776, 1962.
11. WALLENIS, G., y WASCHEWSKY, H. J.: *Acta Soc. Medicorum Uppsal.*, 68, 141, 1963.
12. WILSON, J. F., y LAHEY, H. J.: *Amer. J. Dis. Children*, 105, 635, 1963.

