

Laboratorio de Fisiología Animal
Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona

Ensayos *in vitro* con Fe-59 sobre la capacidad de transporte del hierro sérico en algunas aves y mamíferos *

por

J. Balasch y J. Planas

(Recibido para publicar el 6 de diciembre de 1968)

En trabajos anteriores (3, 6) ha sido analizada la capacidad de fijación del hierro en el suero de gallina, el toro y en el cordero, estudiando su comportamiento *in vitro* en pruebas de sobrecarga. El método de análisis utilizado era de tipo químico, pues se valoraba el hierro no fijado por mediación de la o-fenantrolina según una modificación al propuesto por KLEIN (2). Su aplicación obligaba al empleo de un volumen grande de suero (unos 15 ml aproximadamente), pues a los ensayos *in vitro* se sumaban otras determinaciones complementarias. Ello motivaba que solamente en los mamíferos de talla mediana o grande pudiera analizarse cada ejemplar individualmente, mientras que en el caso de la gallina era necesario reunir varios sueros de distintos ejemplares, que presentaran las mismas características de sexo, edad, etc.

En el presente trabajo se describe un nuevo procedimiento para estudiar la capacidad de transporte del suero frente a sobrecargas de hierro utilizando soluciones de hierro marcado con Fe-59, lo cual

permite realizar ensayos con un volumen reducido de suero o plasma, haciendo factible entonces el estudio por separado de cada ejemplar. Con dicha técnica, se analiza el comportamiento de tres especies de aves y tres de mamíferos.

Material y métodos

Han sido estudiados 40 ejemplares de pavos, 17 de patos y 29 entre pollos y gallinas; en todas las aves se separan los valores según los sexos. Por otra parte se han analizado 75 ejemplares de mamíferos pertenecientes a tres especies (conejo, cerdo y cordero). Los sueros de pavos y patos, así como los de mamíferos proceden de un matadero de esta ciudad, mientras que los correspondientes a la restante especie de aves se han obtenido de ejemplares existentes en este laboratorio.

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

El valor de hierro sérico (SI) y de la capacidad total de fijación de suero (TIBC) para este metal han sido determinados según los métodos descritos por RAMSAY (7, 8). Las valoraciones se han realizado en un fotocolorímetro Spectronic 20, usando microcélulas para los sueros de la especie *Gallus domesticus*, pues se han realizado con sólo 0,5 ml de plasma.

La capacidad latente de fijación de los mismos sueros se ha obtenido directamente siguiendo el método propuesto por BOTHWELL y col. (1) con Fe-59, partiendo de un volumen de suero de 0,25 ml, reduciendo proporcionalmente los restantes constituyentes. Los valores de la capacidad latente (UBIC) pueden también obtenerse indirectamente con los datos suministrados por los métodos de Ramsay (UBIC = TIBC — SI).

El procedimiento para estudiar la fijación de hierro por el suero en un régimen de sobrecargas se ha realizado según un esquema propuesto por nosotros: en cinco tubos de ensayos se añaden 0,25 ml de suero o plasma del ejemplar a estudiar y respectivamente 0,2; 0,15; 0,1; 0,25 y 0,025 ml de una solución de citrato amónico férrico de 625 $\mu\text{g Fe \%}$, obtenida por dilución de una solución madre de 2.500 $\mu\text{g Fe \%}$ marcada con Fe-59, según el procedimiento indicado por WALLENIUS y WASCHEWSKY (9); estas adiciones suponen unas sobrecargas de hierro de 500, 375, 250, 125 y 62 $\mu\text{g Fe}/100$ ml de suero, respectivamente.

Se agitan los tubos y se dejan reposar unos 30 minutos. A continuación se añaden 2 ml de solución saturada de sulfato amónico (Merk) y se igualan todos los tubos con agua bidestilada a un volumen final de 2,45 ml.

Se agitan y se deja que precipiten las proteínas durante 24 horas. Del filtrado se toman 1 ml y se coloca en otra batería de tubos para proceder al conteo de la radiactividad con un equipo Philips

formado por un contador y una sonda de centelleo de tipo pozo.

Diariamente se prepara un standard por duplicado que contenga 0,25 ml de agua destilada, 0,2 ml de la solución de Fe-59 de 625 $\mu\text{g Fe \%}$ y 2 ml de solución de sulfato amónico a saturación, tomándose 1 ml de la mezcla para su conteo.

El cálculo es el siguiente, teniendo en cuenta que 0,2 ml de solución de hierro contiene 1,25 μg de Fe:

$$\mu\text{g Fe no fijado}/100 \text{ ml suero} = \frac{\text{cuentas del problema}}{\text{cuentas del standard}} \times 1,25 \times 4 \times 100$$

Resultados

En la tabla I se indican los valores de hierro sérico (SI), capacidad total de fijación del suero (TIBC), los valores de capacidad latente (UBIC), y los datos referentes al hierro no fijado por el suero *in vitro* al adicionar cantidades crecientes de una solución de hierro marcado.

La relación teórica existente entre el contenido de hierro no fijado o libre, respecto a la cantidad añadida por la misma unidad de volumen, se expresa gráficamente por una recta cuyo origen debe hallarse en el valor de la capacidad latente (UBIC). Dicha recta teórica, indicada en la figura 1 como T, se obtiene al restar a la cantidad de hierro añadida el valor de la capacidad latente (UBIC) dándose valores negativos hasta que no se supera el valor de dicha capacidad.

La recta teórica tiene un origen distinto en cada caso, de acuerdo con el valor de la capacidad latente de fijación, y dado la proporcionalidad del fenómeno su pendiente es de 45°.

Los valores experimentales obtenidos en los ensayos con sobrecargas *in vitro* proporcionan unos datos que son siempre más elevados de lo previsto según la capacidad latente. Este hecho resulta espe-

TABLA I

Valores medios ($\pm \sigma$) del hierro no fijado por el suero frente a sobrecargas crecientes de hierro en varias especies de aves y de mamíferos
Se incluyen los correspondientes valores de hierro sérico (SI) de capacidad total de fijación del suero (TIBC) y de la capacidad latente de fijación (UIBC) determinada ésta según Bothwell y col. (1)

Especie	N.º ejemplares	SI $\mu\text{g Fe \%}$	TIBC $\mu\text{g Fe \%}$	UIBC $\mu\text{g Fe \%}$	$\mu\text{g Fe libre/100 ml}$					
					$\mu\text{g Fe añadido/100 ml}$					
					62	125	250	375	500	
Aves										
Pavo ♀	22	174 ± 51	291 ± 90	127 ± 31	42 ± 32	93 ± 45	153 ± 51	225 ± 54	317 ± 36	
Pavo ♂	18	152 ± 41	356 ± 129	210 ± 36	13 ± 4	39 ± 9	76 ± 15	115 ± 22	161 ± 19	
Pato ♀	5	—	—	119 ± 22	28 ± 14	68 ± 19	168 ± 27	288 ± 21	374 ± 74	
Pato ♂	12	—	—	146 ± 14	29 ± 8	57 ± 14	163 ± 21	274 ± 25	382 ± 34	
Gallina	24	143 ± 53	—	102 ± 24	26 ± 14	71 ± 22	176 ± 29	283 ± 25	377 ± 36	
Pollo	5	130 ± 20	—	113 ± 35	24 ± 11	60 ± 10	174 ± 37	275 ± 14	376 ± 17	
Mamíferos										
Conejo	15	207 ± 21	449 ± 45	242 ± 40	13 ± 7	36 ± 11	93 ± 20	200 ± 24	311 ± 19	
Cordero	15	194 ± 64	437 ± 58	247 ± 35	20 ± 6	48 ± 18	106 ± 23	230 ± 47	343 ± 54	
Cerdo	15	206 ± 36	722 ± 48	478 ± 16	6 ± 2	18 ± 7	78 ± 20	145 ± 36	247 ± 40	

cialmente patente en las adiciones de hierro que no superan dicha capacidad y que por lo tanto deberían dar valores nulos de hierro libre. Parece ser que la técnica propuesta durante la precipitación de las proteínas implica una pequeñísima liberación de Fe-59 contenido en el precipitado, y dada la sensibilidad del método, se oca-

siona un incremento de los datos experimentales.

El distinto comportamiento de los sueros frente a las sobrecargas de hierro *in vitro* se manifiesta por una distinta inclinación de la recta obtenida en cada especie, como puede apreciarse en la figura 1. En ella se han reunido por desplazamiento gráfico a un punto de origen común, desde el cual se ha trazado también la recta teórica. Convencionalmente se ha tomado como origen el de ordenadas, lo cual supondría un valor nulo en la capacidad latente, facilitándose de esta manera la comparación con los datos de la tabla I.

La determinación de la UIBC en los cerdos ha tenido que realizarse además con la adición de 0,3 ml de solución de Fe-59, equivalente a 1,87 μg de Fe, pues dado el alto valor de la capacidad latente, resultaba insuficiente la dosis usada en las otras especies. Igualmente en esta especie y por idéntico motivo, se ha repetido y

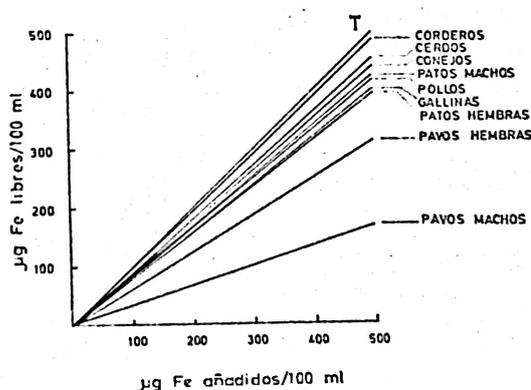


Fig. 1

ampliado la escala de adiciones para las pruebas *in vitro* hasta adiciones de 625 y 750 $\mu\text{g Fe}/100\text{ ml}$, obteniéndose valores de 332 ± 29 y $430 \pm 44\ \mu\text{g Fe}/100\text{ ml}$, que permiten fijar con mayor exactitud la pendiente de la curva en esta especie.

Discusión

Los resultados *in vitro* señalados en la tabla I y expuestos gráfica y comparativamente en la figura 1, muestran que los sueros de los mamíferos si bien se separan algo de los valores previstos teóricamente, sin embargo, la recta teórica cae dentro de la dispersión de los correspondientes valores medios. Igualmente debe señalarse por otra parte, cómo el comportamiento de los sueros de las aves se distancia de la recta teórica y los valores de algunas especies (pato y gallina) se diferencian ya de los mamíferos, aunque sus valores se imbrincan; para otras especies (pavo), la diferenciación es muy evidente.

Un comportamiento diferencial entre aves y mamíferos en pruebas *in vitro* ya ha sido indicado con anterioridad (3), confirmandose nuevamente aquella observación.

Hemos podido comprobar en la gallina (4) cómo la edad y la puesta aumentan notablemente la capacidad de fijación del hierro por el suero en ensayos *in vitro*, separándose aún más del valor teórico. A este respecto debe indicarse que el lote de gallinas analizado en el presente trabajo tiene una edad de tres meses y por lo tanto no había alcanzado el período de puesta. Por otra parte, se desconoce la edad y el estado sexual de las hembras de pavos y patos, debido a su procedencia.

La capacidad de fijación *in vitro* del suero de los pavos machos resulta mayor que en las hembras, y este hecho les separaría de las otras especies; sin embargo, no damos valor a esta observación al faltar una completa garantía en la recolección del material.

En publicaciones anteriores (3, 5) hemos emitido la hipótesis de que en las aves existiría un mecanismo especial de transporte del hierro por el suero que explicaría las peculiaridades que presentan, en especial en el período de puesta, para hacer frente a las necesidades en este metal.

Los ensayos *in vitro* nos muestran también un comportamiento distinto entre las aves y los mamíferos en las pruebas con sobrecargas de hierro, de forma que éstas son capaces de fijar y por ello transportar una cantidad de hierro que es superior a la prevista teóricamente de acuerdo con los valores de las capacidades latentes de fijación de dichos sueros.

Estudios *in vivo* actualmente en curso, llevados a cabo con hierro radiactivo, esperamos nos aclaren el distinto comportamiento existente entre mamíferos y aves, así como el que pueda presentarse dentro de estas últimas entre los sexos.

Resumen

A fin de apreciar las diferencias respecto al transporte del hierro sérico en mamíferos y aves, se describe un método con el empleo de hierro radiactivo que permite analizar individualmente la capacidad de fijación del hierro por el suero frente a sobrecargas de este metal.

Se han utilizado sueros de pavos, patos, gallinas y pollos, comparativamente a los de conejo, cordero y cerdo.

Las pruebas de sobrecarga han sido complementadas con las determinaciones de hierro sérico, capacidad total de fijación y capacidad latente.

Los resultados muestran que la fijación de hierro por los sueros de mamíferos coincide prácticamente con los valores previstos. Por el contrario, el suero de las aves fija mayor cantidad de hierro del que lógicamente le correspondería de acuerdo con los valores de capacidad latente.

La existencia de un mecanismo auxiliar del transporte del hierro sérico en las aves, ya sugerido en otras publicaciones, podría dar una explicación a dicha diferencia.

Summary

«In vitro» Experiments with Fe-59 on the Capacity of Serum Iron Transport in some Birds and Mammals

Tests on iron binding capacity of serum against an overload of ^{59}Fe , have been complemented with the determination of serum iron (SI), total binding capacity (TIBC) and the latent capacity (UBIC). The experiments were made with sera from turkeys, ducks, chickens, rabbits, sheeps and pigs.

The binding capacity of the mammal sera coincides practically with the values that were expected. On the contrary, the binding capacity of bird sera, was higher than the calculated values in accordance with those of latent capacity.

The existence of an auxiliary mechanism of serum iron transport in birds,

previously suggested, should explain the stated difference.

Bibliografía

1. BOTHWELL, T. H., JACOBS, P. y KAMENNER, R.: *South. African J. Med. Sci.*, **24**, 93, 1959.
2. KLEIN, E.: *Acta Haematol.*, **17**, 263 1957.
3. PLANAS, J.: *Nature*, **215**, 289, 1967.
4. PLANAS, J. y BALASCH, J.: *R. esp. Fisiol.*, **25**, 157, 1969.
5. PLANAS, J., CASTRO, S. y RECIO, J. M.: *Nature*, **189**, 668, 1961.
6. PLANAS, J. y FERRARI, L.: *R. esp. Fisiol.*, **22**, 165, 1966.
7. RAMSAY, W. N. M.: *Clin. Chim. Acta*, **2**, 214, 1957.
8. RAMSAY, W. N. M.: *Clin. Chim. Acta*, **2**, 221, 1957.
9. WALLENUS, G. y WASCHEWSKY, H. J.: *Acta Soc. Med. Upsal.*, **68**, 141, 1963.

