

INSTITUTO NACIONAL DE ONCOLOGIA Y RADIOBIOLOGIA

## **Transferrina sérica: purificación, obtención del antisuero específico y estandarización del método de cuantificación\***

Dr. Carlos A. García Santana\*\*

Téc. Juana G. Delgado García\*\*\*

García Santana, C. A.; J. G. Delgado García: *Transferrina sérica: purificación, obtención del antisuero específico y estandarización del método de cuantificación.*

Se informa que la transferrina es una proteína que tiene importantes funciones en diversos mecanismos del organismo, por lo que su determinación puede adquirir importancia diagnóstica y pronóstica en diferentes enfermedades. Se describen los métodos para la purificación de transferrina sérica, la obtención de su antisuero específico y la estandarización del método inmunoquímico de cuantificación. Se expresa los valores de transferrina sérica en diferentes grupos etarios de individuos sanos de nuestra población, así como niños con enfermedades gastrointestinales. Se discute el valor clínico de esta determinación.

### **INTRODUCCION**

En el año 1947, *Holmberg y Laurell* (citado por Brown)<sup>1</sup> le dieron el nombre de transferrina a una proteína sérica que era capaz de unirse al hierro, y señalaron su función en el transporte de hierro por el organismo y su transferencia a las células. A partir de este momento se han realizado estudios multidisciplinarios alrededor de esta proteína, los cuales han aportado el conocimiento sobre su estructura, fisiología y función que actualmente se le conoce. La transferrina, con un peso molecular de alrededor de 77 000 y un coeficiente de sedimentación de 5,5 S,<sup>2</sup> está constituida por una cadena polipeptídica que tiene grupos de ácidos slálcos

\* Este trabajo fue realizado en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Ciudad de La Habana, Cuba.

\*\* Especialista de I Grado en Inmunología. Jefe del Laboratorio de Inmunología Tumoral.

\*\*\* Técnica de Anatomía Patológica e Inmunología.

terminales que están sobre dos cadenas heterosacáridas idénticas. Se sintetiza en varios tejidos del organismo pero, principalmente, en el hígado; tiene una vida media en el humano de 8-10,5 días y aunque no se conoce la manera en que se cataboliza, se cree que se elimina por la secreción gastrointestinal o que puede ser degradada por fagolisosomas de varias células del organismo.<sup>1</sup>

La transferrina es capaz de transportar 2 átomos de hierro, ya que la pérdida de éstos modifica su estructura terciaria y altera sus propiedades antigénicas. Este transporte permite que las necesidades de hierro se satisfagan en cualquier parte del organismo, ya que la transferrina se encuentra en los espacios vasculares y extravasculares en la misma proporción. Se ha señalado que la transferrina actúa como una sustancia de solución amortiguadora que minimiza efectivamente los cambios de la actividad del Fe (III) en el plasma.<sup>3</sup> No se conocen los mecanismos que tienen las células para obtener el hierro de la transferrina, aunque ya existen algunas hipótesis en este sentido.<sup>1</sup>

Se ha informado que esta proteína con propiedades quelantes, es capaz también de unirse eficientemente a la mayoría de los iones de los metales de transición, como son el Co (III), Cu (II), Mn (III), Zn (II) y Ni (II).<sup>4</sup>

Parece ser que la transferrina interviene en otros procesos biológicos, ya que se le han encontrado propiedades bacteriostáticas<sup>5</sup> y que es importante como nutriente en el crecimiento y proliferación de los linfocitos T.<sup>6</sup>

Se ha informado que ocurren variaciones de la transferencia sérica durante el embarazo<sup>3</sup> y en algunas enfermedades.<sup>7-11</sup>

La determinación de los niveles séricos de transferrina por métodos inmunoquímicos es sencilla, confiable y específica y no tiene los inconvenientes del método que utiliza la capacidad total de unión de hierro del suero.<sup>12</sup>

En el presente trabajo se describen las metodologías para la purificación de la transferrina sérica humana, a partir de suero humano, la obtención de su antisuero específico y la estandarización del método inmunoquímico de cuantificación de transferrina sérica, y se aplican estos resultados en el estudio de diferentes grupos etarios de individuos sanos y de individuos con afecciones gastrointestinales de la Ciudad de La Habana.

## MATERIAL Y METODO

*Purificación de transferrina.* Desarrollamos una metodología propia partiendo de dos métodos descritos en la literatura.<sup>13,14</sup> Se obtuvo una mezcla de sueros de diferentes donantes del Banco de Sangre y se le cuantificó la concentración de proteínas por microbiuret. Se le ajustó la concentración de proteínas al 3% con agua destilada y se ajustó al pH 8 con cristales de TRIS. Se le añadió Rivanol al 0,84% de concentración final, con agitación constante. Se centrifugó a 800 x G durante 30 min, desechándose el precipitado. Al sobrenadante se le ajustó el pH a 7 y se le añadió NaCl

al 5% de concentración final. Se centrifugó igual que anteriormente y se desechó el precipitado. Al sobrenadante se le añadió sulfato de amonio para una concentración final 2 M, con agitación constante. Se centrifugó igual que anteriormente y se desechó el precipitado. El sobrenadante se dializó contra la solución amortiguadora de fosfato de potasio 0,1 M, pH 7 y se concentró hasta 1/4 de su volumen original. Se le añadió sulfato de amonio para una concentración final de 2,24 M y se centrifugó igual que en los pasos anteriores. El sobrenadante se dializó contra la solución amortiguadora al fosfato de potasio 0,02 M, pH 6,3. Se activó una columna de CM-celulosa equilibrada en la misma solución amortiguadora. Se eluyó la muestra con estas condiciones y se recogieron fracciones de 5 ml. El primer pico eluido se concentró y se dializó contra la solución amortiguadora de potasio 0,005 M, pH 8. Se activó una columna de DEAE-32 celulosa equilibrada con la misma solución. Se eluyó la muestra con estas condiciones y se recogieron fracciones de 5 ml. Después que se obtuvo el primer pico se hizo un gradiente discontinuo con solución amortiguadora de potasio 0,04 M, pH 6,3. En el segundo pico después de esta última elución fue donde obtuvimos la transferencia pura, comprobada por inmunoelectroforesis<sup>15</sup> y por inmunodifusión radial.<sup>16</sup> Este último pico se dividió en 3 partes y se le cuantificó la concentración de proteínas por densidad óptica.<sup>17</sup>

*Obtención del suero antitransferrina humana.* A una de las soluciones de transferrina pura se le ajustó la concentración de proteínas a 1 mg/ml. Se inmunizó una cabra en varias regiones por vía subcutánea con adyuvante completo de Freund, a razón de 1 mg de proteína una vez por semana y durante 5 semanas. Se le hizo una pequeña extracción de sangre para probar el antisuero. Se comprobó la especificidad del antisuero por inmunoelectroforesis y por inmunodifusión radial. A partir de este momento se le extraen 100-200 ml de sangre cada 2 ó 3 meses. Una semana antes de cada extracción se le inyecta al animal una dosis de inmunización. A los antisueros así obtenidos se les eliminaron las lipoproteínas, se les añadió azida sódica como preservativo y fueron envasados en fracciones de 1 ml para posteriormente liofilizarse al vacío y ser guardados a -20 °C hasta su utilización.

*Estandarización del método de cuantificación de la transferrina sérica.* El método que utilizamos para cuantificar la transferrina sérica fue el de la inmunodifusión radial.<sup>16</sup>

En primer lugar, se determinaron las diluciones adecuadas de trabajo para el antisuero y para el suero humano.

Se preparó un patrón primario y un patrón secundario para la cuantificación de la transferrina. Se utilizó como patrón primario diferentes diluciones con concentración conocida de la transferrina purificada. El patrón secundario se hizo con una mezcla de sueros frescos de donantes de Banco de Sangre, a la cual se le eliminó las lipoproteínas; se le añadió azida sódica como preservativo, se envasaron en fracciones de 1 ml y se liofilizaron al vacío, guardándose a -20 °C hasta su utilización. Se tomaron varios

bulbos de este suelofilizado y se reconstituyeron con 1 ml de agua bi-distilada.

Se le hicieron varias diluciones independientemente y se les determinaron las concentraciones de transferrina a partir del patrón primario. Se escogieron cinco diluciones del patrón secundario para las determinaciones de transferrina.

Para cada experiencia se utilizó un bulbo nuevo de patrón secundario.

Para la técnica de inmunodifusión radial se utilizaron placas fotográficas desechadas de microscopia electrónica de 9,2 x 11,9 cm, lavadas adecuadamente, a las cuales se les vertió 16 ml de la solución agar-antisuero previamente fundido y mezclados a 56 °C para una concentración final de agar de 1,5% y una dilución final de antisuero de 1:8. Tanto en la preparación del agar como en las diluciones de antisuero, patrón secundario y muestras de suero humano se utilizó la solución amortiguadora veronal-HCl pH 8,6. A cada placa se les abrieron 35 pozuelos de 2,5 mm de diámetro y separados entre sí 1,5 cm de distancia. Cada pozuelo se llenó con seis microlitros de muestras. El patrón secundario se distribuyó siempre de igual forma por toda la placa. Las placas se dejaron difundir en cámara húmeda durante 48 horas y a 4 °C. Se lavaron con varios cambios de NaCl al 0,85% durante 24 horas. Las placas se secaron poniéndole un papel de filtro en su superficie a 37 °C. Se tiñeron con negro amido 10 B durante 10 min.

Para la medición del diámetro de los discos se utilizó un lector de microfilm Carl Zeiss, con un aumento 6,5 x, realizándose las mediciones con una regla plástica con divisiones de 0,5 mm. En cada disco se midieron dos diámetros ortogonales y se promediaron.<sup>18</sup>

Para el cálculo de las concentraciones hallamos la recta de los mínimos cuadrados con los datos obtenidos con las diluciones del patrón secundario. Se calcularon los estadígrafos de cada grupo de muestras estudiados. Para la comparación de los resultados utilizamos la t de Student. Para todos los cálculos se tuvo en cuenta la distribución logaritmo normal.<sup>19</sup>

*Aplicación del sistema estandarizado.* Se les determinaron los niveles de transferrina a:

Cuarenta y tres muestras de sangre del cordón umbilical obtenidas en el momento del parto de niños a término del Hospital Ginecoobstétrico "Ramón González Coro".

Trescientos diez niños sanos eutróficos que tomaron parte del programa de determinación de parámetros bioquímicos normales que se realizó en el CENIC en coordinación con otros organismos.

Doscientos adultos donantes del Banco de Sangre de la Ciudad de La Habana.

Veintinueve niños con síndrome de malabsorción intestinal del Hospital Pediátrico "William Soler".

Cincuenta y tres niños con giardiasis diagnosticados en el Hospital Pediátrico "Pedro Borrás Astorga".

## RESULTADOS Y DISCUSION

Con el método de purificación de transferrina desarrollado por nosotros hemos obtenido sistemáticamente en todas las experiencias realizadas, fracciones de transferrina con un alto grado de pureza. El rendimiento siempre ha estado por encima del 30%, lo cual garantiza que se puedan obtener cantidades considerables de la proteína pura.

En algunas de las purificaciones realizadas nos hemos encontrado que en la parte final del último pico donde se obtiene la transferrina, al realizarle las pruebas inmunoquímicas, aparece un desdoblamiento de los arcos de precipitación de la transferrina. Probablemente esto se produce por alguna de las variantes genéticas que tiene ésta.

El suero antitransferrina obtenido tiene una alta especificidad, no encontrándose ningún contaminante en el mismo. Para estandarizar la técnica de cuantificación utilizamos una dilución del suero de 1:3 y del anti-suero de 1:8, lo cual no quiere decir que puede emplearse en diluciones superiores como lo hemos comprobado en nuestro laboratorio. Este anti-suero ha sido utilizado después de cuatro años de guardado y ha mantenido adecuadamente todas sus cualidades biológicas que incluye la dilución de trabajo.

Los resultados obtenidos de la aplicación del sistema estandarizado para cuantificar transferrina sérica se resumen en el cuadro.

Estos resultados nos dan, por un lado, un perfil del comportamiento de la concentración de transferrina desde el nacimiento hasta el adulto de nuestra población sana y, por otro lado, nos brinda el comportamiento de la concentración de transferrina de algunas de las enfermedades gastrointestinales de nuestra población infantil, los cuales hemos analizado en trabajos anteriores.<sup>20</sup> La concentración de transferrina sérica se considera actualmente como uno de los parámetros más importantes para conocer el estado nutricional del ser humano y puede tener valor pronóstico en algunas enfermedades.<sup>10,11</sup>

La concentración de transferrina se puede encontrar elevada en las anemias ferriprivas, durante el embarazo, durante la administración de estrógenos y en la hipoxia aguda. Se pueden encontrar niveles bajos en la desnutrición proteico-calórica, la hepatitis viral, en las otras infecciones, en la nefrosis y en la atranferrinemia congénita.<sup>1</sup>

Por otra parte, la transferrina purificada puede ser utilizada en la elaboración de medios de cultivo controlados,<sup>21,22</sup> las cuales son de gran importancia en los estudios *in vitro* de la biología celular y para desarrollar los métodos de detección de receptores de transferrina por radioensayos, los cuales tienen valor como un parámetro que mide la proliferación celular.

Tabla. *Concentración de transferrina sérica*

	n	X	X + 2DS	X - 2DS	p**(b)
Niños recién nacidos	43	435	673	281	
Niños sanos eutróficos	310	260	340	200	
Adultos donantes de Banco de Sangre	200	201	351	115	
Niños con síndrome de malabsorción	29	410	749	225	< 0,01
Niños con giardiasis	53	243	702	84	

\*: Número de muestras.

\*\* : Los resultados están expresados en *mg/dl*.

\*\*\*: La comparación se realizó contra el grupo de niños sanos.

## CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un método para purificar transferrina sérica que tiene un rendimiento por encima del 30%.
2. Se obtuvo un suero antitransferrina monoespecífica que permitió estandarizar el método inmunoquímico de cuantificación de transferrina sérica.
3. Se informan los valores de transferrina sérica de 3 grupos etarios de nuestra población sana.

## Agradecimientos

*Reconocemos la cooperación brindada por el personal de los hospitales "Ramón González Coro", "William Soler" y "Pedro Borrás Astorga", en el estudio desarrollado en este trabajo.*

## SUMMARY

García Santana, C. A.; J. G. Delgado García. *Serum transferrin: purification, attainment of specific antiserum and standardization of quantitation method.*

It is reported that transferrin is a protein involved in important functions in several mechanisms of the organism, reason why its determination can be of diagnostic and prognostic importance for different diseases. Methods used for serum transferrin purification, for the attainment of its specific antiserum and standardization of quantitation immunochemical method are described. Values of serum transferrin in different age groups of healthy individuals in our population, as well as in children with gastrointestinal diseases, are expressed. Clinical value of the determination is discussed.

## RÉSUMÉ

García Santana, C. A.; J. G. Delgado García: *Transferrine sérique: purification, obtention de l'antisérum spécifique et standardisation de la méthode de dosage.*

La transferrine est une protéine qui joue un rôle très important dans divers mécanismes de l'organisme, donc son dosage peut avoir une importance diagnostique et pronostique

dans différentes maladies. Dans ce travail les auteurs décrivent les méthodes pour la purification de la transferrine sérique, l'obtention de son antisérum spécifique et la standardization de la méthode immunochimique de dosage. Il est signalé les valeurs de transferrine sérique dans différents groupes d'âge d'individus sains de notre population, ainsi que chez des enfants porteurs de maladies gastro-intestinales. Enfin, il est discuté la valeur clinique de ce dosage.

## BIBLIOGRAFIA

1. *Brown, E. B.*: Transferrin: physiology and function in iron transport. CIBA. Foundation Symposium (New Series 51) Elsevier Publishing Co. Excerpta Medica. North Holland, Amsterdam, Oxford, New York, 1977. P. 125.
2. *Shultze, E. H.; J. F. Heremans*: Molecular Biology of Human Proteins. Elsevier Pub. Co., Amsterdam, London, New York, 1966. Pp. 348.
3. *Laurell, C. B.*: The Plasma Proteins. Vol. 1 New York, Ed. F. W. Patham, 1960. P. 349.
4. *Frieden, E.*: Reviews. Copper and iron metalloproteins. TIBS, Dec., 273, 1976.
5. *Fletcher, J.*: The effect of iron and transferrin on the killing of E. Coli in fresh serum. Immunol 20: 493, 1971.
6. *Dillner-Centerlind, M. L. et al.*: Transferrin can replace serum for in vitro growth of mitogen-stimulated T lymphocytes. Eur J Immunol 9: 942, 1979.
7. *Gabr, M. et al.*: Serum transferrin in Kwashiorkor. J Trop Med Hyg 74: 216, 1971.
8. *Stephens, A. J. H.*: A points system, using clinical and biochemical parameters to identify malignant Kwashiorkor. Ann Trop Med Parasitol 68: 453, 1974.
9. *Tryshkova, L. O.; A. O. Blandszvich*: Ceruloplasmin activity and latent saturation of transferrin with iron in infectious hepatitis in children. Pediatr Akush Ginekol 33: 6, 1972.
10. *Mosawe, A. E. J.; J. Rwabwogo-Atenyi*: Serum proteins and transferrin determinations to distinguish Kwashiorkor from iron deficiency anaemia. Arch Dis Child 48: 927, 1973.
11. *Reeds, P. J.; Laditan, A. O.*: Serum albumin and transferrin in protein-energy malnutrition, their use in the assessment of marginal undernutrition and the prognosis of severe undernutrition. Br J Nutr 36: 255, 1976.
12. *Van der Houli, C. et al.*: The binding of iron to transferrin and to other serum components at different degrees of saturation with iron. Clin Chim Acta 38: 347, 1972.
13. *Nagler, A. L. et al.*: Improved isolation of purified siderophilin from individual sera. Proc Soc Exptl Biol Med 111: 746, 1982.
14. *Shultze, H. E.; J. F. Heremans*: Molecular Biology of Human Proteins. Elsevier, Amsterdam, 1966.
15. *Cawley, L. P.*: Electrophoresis and Immunoelectrophoresis. Little, Brown, Boston (s/a).
16. *Mancini, G. et al.*: Immunochemical quantitation of antigens of a single radial immunodiffusion. Immunochem 2: 235, 1965.
17. *Oriol, R.; R. Binaghi*: Preparation d'anticorps monospécifiques anti-immunoglobulines. Ann Inst Pasteur 114: 713, 1968.
18. *Fernández, J. L.; C. García Santana*: Ajuste del método de inmunodifusión radial y preparación de un suero de referencia. Rev CENIC 9: 1, 1978.

19. *Weeke, B.; P. A. Kasilnikoff*: The concentration of 21 serum proteins in normal children and adults. *Acta Med Scand* 192: 149, 1972.
20. *García, C. A.; H. Pauste; Y. Porro; M. Moroño; B. R. Manzano; J. Delgado*: Determinación de los niveles de transferrina sérica en niños recién nacidos y en niños con síndrome de malabsorción intestinal. *Rev Cub Ped* 53: 119, 1981.
21. *H. Murakami; H. Masui; G. G. Sato; N. Sueoka; T. P. Chow; Kano-Sueoka*: Growth of hybridoma cells in serum-free medium ethanalamine as an essential component. *Proc Natl Acad Sci* 79: 1158-1162, 1982.
22. *W. L. Cleveland; I. Wood; B. F. Erlanger*: Routine large-scale production in monoclonal antibodies in a protein-free culture Medium. *J Immunol Meth* 56: 221-234, 1983.

Recibido: 1 de octubre de 1984

Aprobado: 28 de noviembre de 1984

*Dr. Carlos A. García Santana*

Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología

Ciudad de La Habana

Cuba