

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de bioquímica y biología molecular II

**EL RECEPTOR SOLUBLE DE LA TRANSFERRINA:
ESTUDIO CLÍNICO DE UN NUEVO MARCADOR DEL
METABOLISMO DEL HIERRO**

VICENTE CASCANTE BURGOS

Madrid, 1999

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

**EL RECEPTOR SOLUBLE DE LA TRANSFERRINA:
ESTUDIO CLÍNICO DE UN NUEVO MARCADOR
DEL METABOLISMO DEL HIERRO**

AUTOR:

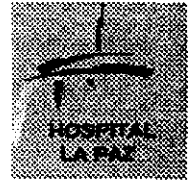
D. Vicente Cascante Burgos.

DIRECTOR:

Dr. Francisco Arnalich Fernández

Trabajo presentado para obtener el Grado de Doctor en Farmacia

Madrid, Junio de 1999.



Francisco Arnalich Fernández, Profesor Titular de Medicina, del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y Jefe de Sección de Medicina Interna del Hospital Universitario “La Paz”,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “**El receptor soluble de la transferrina: estudio clínico de un nuevo marcador de Metabolismo del hierro**” ha sido realizada bajo su dirección y supervisión, por D. Vicente Cascante Burgos.

Una vez redactada la presente Memoria ha sido revisada por el que suscribe, encontrándola **apta** para ser presentada y defendida ante el Tribunal que en su día se designe.

Madrid, 31 de Mayo de 1999

DEDICATORIA:

*A mi madre,
a mi novia,
a mis hermanos,
y a mis amigos.*

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra Fernández Zamorano, que siempre me brindó todos los medios a su alcance, además de su inestimable apoyo personal y profesional.

Al Dr Arnalich Fernández, Director de la Tesis, por su disposición, su dedicación, y su asesoramiento científico.

A las Doctoras Jiménez, Larrocha, y Fernández de Castro, y a las Enfermeras Inés Galán, Carmen Latienda, y Maria Jesús Tamarit , sin cuya colaboración e interés no hubiera sido posible la realización de este estudio.

A la Dra De Pedro, por su ayuda determinante.

A los compañeros de Residencia, adjuntos, enfermeras y auxiliares de los Laboratorios del Hospital "La Paz", de los que guardo un recuerdo nostálgico.

Y especialmente a mis seres más queridos, que me han alentado y empujado de forma incondicional, en mis proyectos de estos últimos años.

ÍNDICE

**1. EL METABOLISMO DEL HIERRO EN EL HOMBRE
Y SUS ALTERACIONES**

1.1. Funciones del hierro en el hombre.....	2
1.2. El ciclo del hierro: Compartimentos.....	3
1.3. El flujo de hierro en el organismo.....	4
1.3.1 ABSORCIÓN INTESTINAL.....	6
1.3.2. TRANSPORTE PLASMÁTICO: TRANSFERRINA.....	9
1.3.3. PASO AL INTERIOR CELULAR: RECEPTOR DE LA TRANSFERRINA.....	12
1.3.4. MOVIMIENTO INTRACELULAR DEL HIERRO.....	20
1.3.5. DEPÓSITO DE HIERRO: FERRITINA y HEMOSIDERINA.....	21
1.3.6. PÉRDIDAS FISIOLÓGICAS.....	24
1.3.7. NECESIDADES ORGÁNICAS DE HIERRO.....	24
1.4. Anemia ferropénica.....	25
1.5. Anemia de los trastornos crónicos.....	27
1.6. Sobrecarga de hierro.....	30

**2. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL
METABOLISMO DEL HIERRO**

2.1. Exploración por compartimentos

2.1.1. COMPARTIMENTO FUNCIONAL.....	36
2.1.2. COMPARTIMENTO DE DEPÓSITO.....	37
2.1.3. COMPARTIMENTO DE TRANSPORTE.....	40
2.1.4. OTROS PARÁMETROS.....	44

2.2. Diagnóstico analítico de los desbalances del hierro

2.2.1. LA ANEMIA FERROPÉNICA.....	46
2.2.2. LA ANEMIA DE LOS TRASTORNOS CRÓNICOS.....	48
2.2.3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE UNA ANEMIA MICROCÍTICA E HIPOCRÓMICA.....	48
2.2.4. DIAGNÓSTICO DE LA HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA.....	49
2.2.5 ANALÍTICA PARA EL CONTROL DEL TRATAMIENTO DE LA SOBRECARGA DE HIERRO.....	49

**2.3. Limitaciones de las determinaciones del perfil férrico
en la delimitación de los desbalances del metal**

2.3.1. LA DIFICULTAD DE DISTINGUIR UNA ANEMIA FERROPÉNICA DE UNA ATC.....	51
2.3.2. DETECCIÓN PRECOZ DE LA HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA.....	52

2.4. El receptor soluble de la transferrina.....54

**2.5. Conocimientos actuales sobre el significado de la
concentración de sTfR.....58**

2.5.1. LA ERITROPOYESIS.....	58
2.5.2. LAS CITOQUINAS Y LA INFLAMACIÓN.....	61
2.5.3. EL METABOLISMO DEL HIERRO.....	61

3. OBJETIVOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS:

4.1. Pacientes.....67

4.2. Métodos

 4.2.1. ESTUDIO MICROSCÓPICO DEL ASPIRADO Y BIOPSIA
 MEDULAR.....68

 4.2.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE.....68

 4.2.3. EVALUACIÓN DEL METABOLISMO DEL HIERRO.....70

 4.2.4. EVALUACIÓN DE LA ERITROPOYESIS.....73

 4.2.5. RESPUESTA INFLAMATORIA CRÓNICA.....73

4.3. Análisis estadístico.....74

5. RESULTADOS:

5.1. Estudio preliminar de las variables

 5.1.1. INFLUENCIA DEL ESTADO Y DISPOSICIÓN DEL HIERRO
 EN MÉDULA ÓSEA SOBRE LOS PARÁMETROS DEL
 PERFIL FÉRRICO Y EL HEMOGRAMA.....76

 5.1.2. LOS PARÁMETROS DEL PERFIL FÉRRICO Y HEMOGRAMA
 EN LOS DISTINTOS ESTADIOS DE LA FERROPENIA.....83

 5.1.3. LA DEFICIENCIA FUNCIONAL DE HIERRO.....85

 5.1.4. LA ACTIVIDAD CELULAR EN MÉDULA ÓSEA:
 HEMATOPOYESIS Y ERITROPOYESIS.....91

 5.1.5. LA INFLAMACIÓN.....98

**5.2. Estudio de las variaciones de la concentración
sérica de sTfR**

5.2.1. RELACIÓN CON CADA VARIABLE

5.2.1.1. <u>El patrón de disposición de hierro en médula ósea</u>	102
5.2.1.2. <u>La deficiencia funcional de hierro</u>	102
5.2.1.3. <u>El estadio de la ferropenia</u>	107
5.2.1.4. <u>La eritropoyesis</u>	107
5.2.1.5. <u>La inflamación</u>	108

5.2.2. INFLUENCIA DE CADA VARIABLE

5.2.2.1. <u>Los modelos lineales generalizados</u>	114
5.2.2.2. <u>Estudio detallado de cada factor</u>	115
5.2.2.3. <u>El sTfR en pacientes que no presentan situaciones que aumenten, disminuyan, o alteren sus niveles</u>	131

6. DISCUSIÓN:

6.1. Estudio de las variables analizadas.....	134
6.2. Relación entre las concentraciones de sTfR y las variables estudiadas.....	140
6.3. Significado de las variaciones en la concentración sérica de sTfR.....	142

7. CONCLUSIONES

8. RESUMEN

9. BIBLIOGRAFIA

**1. EL METABOLISMO DEL HIERRO EN EL HOMBRE
Y SUS ALTERACIONES**

1. 1. Funciones del hierro en el hombre

El hierro formaba parte de las rutas metabólicas de las primeras formas de vida de la tierra. Hoy su función es indispensable para la mayoría de los seres vivos, incluido el hombre, en el que es el oligoelemento esencial más abundante.

La intervención del hierro en los procesos biológicos y bioquímicos, se debe a dos de sus propiedades químicas (1):

- Su potencial redox, que le hace intervenir en reacciones de oxidoreducción.
- Su capacidad de formar complejos de coordinación con una gran variedad de ligandos.

Las funciones biológicas en las que está implicado el hierro en el hombre son las siguientes:

- 1-Fijación, transporte y almacenamiento de oxígeno e hidrógeno molecular.
- 2-Intervención en procesos redox de transferencia de electrones. Participa en rutas metabólicas como la cadena respiratoria mitocondrial, oxigenaciones, hidroxilaciones, descomposición del peróxido de hidrógeno, etc.

Para desarrollar estas funciones el hierro se integra en estructuras proteicas. Entre ellas destaca la hemoglobina, molécula presente en la sangre, y que cumple la función de oxigenar células, tejidos, y órganos. Pero también forma parte de otras moléculas (2):

- La mioglobina que oxigena el músculo.
- Los citocromos a,b y c, implicados en la transferencia de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial
- La catalasa y la peroxidasa, enzimas destoxificadoras que impiden la formación de radicales libres.
- El citocromo P-450 también con función depuradora.
- La ribonucleótido reductasa relacionada con la síntesis de nucleótidos.

- Las proteínas de unión a elementos sensibles al hierro(IRE-BP) reguladoras del metabolismo celular del hierro.
- La xantina oxidasa que interviene en el catabolismo de las purinas.
- La aconitasa del ciclo de Krebs.
- La lactoferrina presente en secreciones como leche, lágrimas y aparato genitourinario e implicada en la respuesta inmune.

Existen proteínas que regulan el balance orgánico del hierro

- Proteínas de transporte: transferrina, receptor de transferrina, y mobilferrina.
- Proteínas de depósito: ferritina y hemosiderina.

Se han descrito otras ferroproteínas, pero su estructura y función es poco conocida.

1.2. El ciclo del hierro: Compartimentos:

Un adulto sano tiene entre 3 y 4 gramos de hierro en su cuerpo, y sin embargo sólo intercambia con el exterior 1 miligramo diario (3). En comparación con otros mamíferos absorbemos entre 50 y 100 veces menos hierro por Kg de peso, cantidad que se incrementa entre 4 y 8 veces en situaciones de deficiencia (4, 5). Y las pérdidas son proporcionalmente la décima parte (6).

Por lo tanto en el hombre el balance del hierro es conservador y ahorrativo, y se basa en un continuo reciclaje (7, 8). La capacidad de absorción y eliminación es pequeña. La respuesta homeostática en situaciones de desequilibrio es limitada y muchas veces insuficiente. Esto explica la gran prevalencia de patologías del disbalance del hierro, especialmente la deficiencia (9). Además somos de las pocas especies que sufren enfermedades por sobrecarga.

Se distinguen tres compartimentos de hierro en el organismo:

a) Compartimento funcional: Supone aproximadamente el 75% del hierro orgánico. De este el 80% se encuentra formando parte de la hemoglobina contenida en los eritrocitos (2,5 g). El 20% restante (0,5 g) está en la mioglobina muscular, en los citocromos y en las enzimas.

b) Compartimento de transporte: En él se realiza el movimiento orgánico del metal. Está constituido por 2,5 a 4 mg de hierro que son transportados en la sangre por la transferrina.

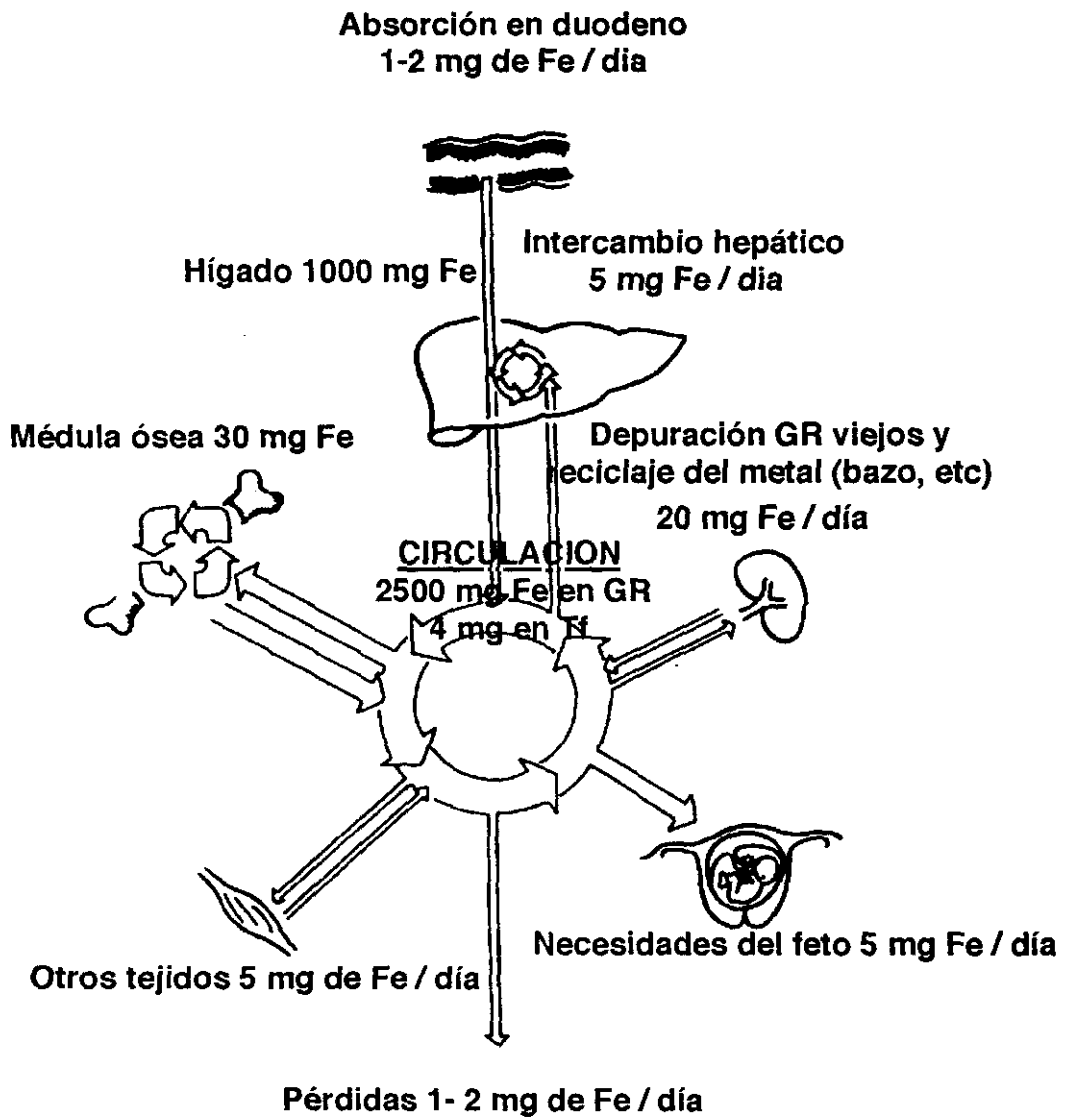
c) Compartimento de depósito: La tercera parte del hierro orgánico (aproximadamente 1 g) se encuentra almacenado en forma de ferritina o hemosiderina. Pero esta cantidad es muy variable y depende del balance orgánico de hierro.

1.3. El flujo del hierro en el organismo:

Las 4/5 partes del hierro existente en el compartimento de transporte circulan desde los macrófagos del sistema retículo endotelial (que han depurado los glóbulos rojos viejos) hasta los eritroblastos (que sintetizan hemoglobina) de la médula ósea. En este ciclo se movilizan más de 20 mg de hierro al día (10). También es importante el movimiento de hierro entre el hepatocito y el compartimento de transporte. Este acontece en un proceso de difusión pasiva cuya dirección depende de la cantidad de hierro del hepatocito y de la sideremia (11). Durante el embarazo existe un movimiento "generoso" del oligoelemento hacia la placenta para cubrir las necesidades fetales (12).

El intercambio de hierro entre los distintos compartimentos y de estos con el medio externo se realiza mediante los procesos de absorción, transporte, depósito y eliminación (figura 1).

Figura 1. El ciclo orgánico del hierro en el hombre



1.3.1. ABSORCIÓN INTESTINAL :

Se produce en el tracto digestivo, concretamente en el duodeno y el yeyuno proximal a partir del hierro ingerido en la dieta. En condiciones normales la alimentación diaria contiene aproximadamente 15 mg de hierro. De ellos sólo el 50 % se encuentra en forma soluble. A la célula intestinal entran 3 mg y únicamente 1 mg pasa al torrente sanguíneo (13). Las etapas del proceso de absorción de hierro son

- Unión del hierro al borde del cepillo intestinal.
- Paso al enterocito.
- Depósito intracelular.
- Transporte transcelular.

a) Paso del hierro desde la luz intestinal al enterocito:

El hierro de la dieta se encuentra o unido al grupo heme o como catión inorgánico. Los procesos de absorción de estas dos formas son diferentes (14, 15):

-El hierro heme se absorbe de manera mucho más eficaz que el inorgánico (16). El proceso no depende de la composición química de la dieta. En situaciones de deficiencia se puede llegar a absorber entre el 20 y el 40% del hierro heme ingerido. Al principio actúan las proteasas gástricas que separan el heme de la globina. El complejo hierro-heme se absorbe intacto, y en el enterocito se disocia. Los alimentos de origen animal son la fuente principal de este tipo de hierro. Estos no forman parte de la dieta de los países pobres en los cuales hay una gran prevalencia de anemia ferropénica.

-El hierro inorgánico se encuentra en mayor cantidad que el heme en los alimentos (17, 18). Sin embargo tiene menor disponibilidad. Su absorción depende de la cantidad de ión que hay en forma soluble en la luz intestinal, y que varía dependiendo de la composición química de la comida. La mayoría del catión inorgánico se encuentra en forma férrica y por lo tanto insoluble a pH superior a 3. Al pH del estómago se une a las mucinas. Estas lo mantienen soluble cuando el pH aumenta en duodeno y yeyuno, y favorecen su reducción a catión ferroso con las secreciones alcalinas del páncreas (19). En el intestino proximal la solubilidad del hierro está preservada. El complejo hierro mucina se acopla a la integrina, molécula presente en la

membrana apical de las células de la mucosa intestinal. Este complejo se asocia a la mobilferrina citosólica y la macroestructura pasa al interior del enterocito por un mecanismo desconocido (20). Las flavinas parecen favorecer que el catión pase al interior en un estado redox adecuado (19).

Se han propuesto otros mecanismos de absorción mas controvertidos:

-Difusión pasiva (21).

-Absorción mediada por unas proteínas detectadas en las vesículas de las microvellosidades del intestino delgado con alta afinidad por el hierro (22).

El proceso de entrada desde la luz intestinal al enterocito es más rápido y esta menos afectado por la cantidad de hierro absorbible digerido y por las necesidades homeostáticas que los que le siguen (23) (depósito intracelular de hierro, transporte transcelular y paso a la circulación portal). No obstante también está sometido a regulación, en virtud del control del número de receptores de membrana (24). En su control influyen el contenido de hierro de la célula de la mucosa y la cantidad de hierro orgánico (25).

b) Depósito intracelular en el enterocito y transporte transcelular:

Una vez que está en el enterocito, una parte del hierro se dirige hacia la membrana basal en un proceso rápido que dura de dos a cuatro horas (26). Otra parte se acumula en la ferritina. Pequeñas cantidades de este depósito pueden salir hacia la circulación portal. En las células de la mucosa intestinal no se ha detectado RNA mensajero de transferrina (27) pero si se ha detectado de las subunidades L y H de la ferritina (28). Esto sugiere que la transferrina no está implicada en el transporte de hierro a través de la célula, pero que la ferritina si tiene un papel regulador a este nivel, controlando la absorción de hierro en función de las necesidades orgánicas. Cuando hay deficiencia se inhibe la síntesis de ferritina en el enterocito y pasa mas hierro al torrente sanguíneo. En situaciones de sobrecarga la "defensa" fisiológica es estimular la síntesis, de manera que gran parte del metal absorbido se deposite en la molécula y finalmente se pierda con la descamación fisiológica de las células.

El proceso de paso a la circulación portal no se conoce bien.

c) Factores que influyen en la absorción del hierro:

-Necesidades orgánicas:

Status férrico:

En la deficiencia aumenta la absorción. Este estímulo está mediado tanto por la cantidad de hierro del enterocito, como por el estado de los depósitos de hierro. En ratas sometidas a transplante de intestino procedente de ratas con deficiencia de hierro se observa un aumento en la absorción (29). Ello implica directamente al status férrico de la célula de la mucosa intestinal en la regulación de la absorción.

Otro condicionante regulador de este paso es el estado de los depósitos de hierro orgánicos (30).

Los dos factores descritos están íntimamente relacionados.

-Actividad eritropoyética: El aumento de la actividad eritropoyética genera una mayor demanda de hierro. Se ha demostrado que la absorción es mayor cuando la eritropoyesis es inefectiva como en talasemias y anemias sideroblásticas (31), y también al transfundir reticulocitos (32).

-Otros factores:

Cantidad de hierro que contienen los alimentos.

Composición química de la dieta (33): Los alimentos de origen animal son una fuente de hierro heme de biodisponibilidad alta. Estos habitualmente no forman parte de la dieta de los países pobres. La absorción del hierro inorgánico varía con la composición de la dieta. Algunos compuestos disminuyen la absorción como los fitatos de la fibra, los tanatos, los fosfatos, los polifenoles, y el EDTA frecuentemente utilizado como aditivo. Los alimentos que tienen estas sustancias en gran cantidad disminuyen el aprovechamiento orgánico del hierro ingerido. Es el caso de las lentejas, las espinacas, la yema de huevo y el té. Por el contrario determinados ácidos orgánicos como el ácido cítrico, láctico, málico, tartárico y fundamentalmente el ascórbico favorecen la absorción por facilitar la reducción de ión férrico a ferroso, y también por formar un complejo con el catión de mayor absorción. Entre los alimentos vegetales que contienen estos ácidos están las naranjas, el tomate y las coliflores.

Procesos digestivos: La motilidad intestinal y el pH juegan un papel transcendental en la liberación del metal de los alimentos y en su solubilización. En algunas patologías digestivas como la aclorhidria la absorción se encuentra comprometida.

1.3.2. TRANSPORTE PLASMÁTICO: TRANSFERRINA:

El hierro se transporta en el torrente sanguíneo unido a la transferrina. Este compartimento representa sólo el 0,05 % del orgánico total (11, 34). El metal tiene en plasma una semivida de una hora y la transferrina de 8 días (10). Por lo tanto cada molécula de transferrina realiza aproximadamente cien ciclos de transporte de hierro. Las 4/5 partes del flujo se desarrollan entre el macrófago y la eritrona. Pero la transferrina también transporta hierro procedente de los depósitos y de la absorción intestinal .

La transferrina sérica se sintetiza en el hígado. La síntesis está estimulada en la privación de hierro por un mecanismo en el que parece intervenir el AMPc (35), y disminuye en la desnutrición, la insuficiencia hepática y la inflamación (36).

a) Estructura de la transferrina:

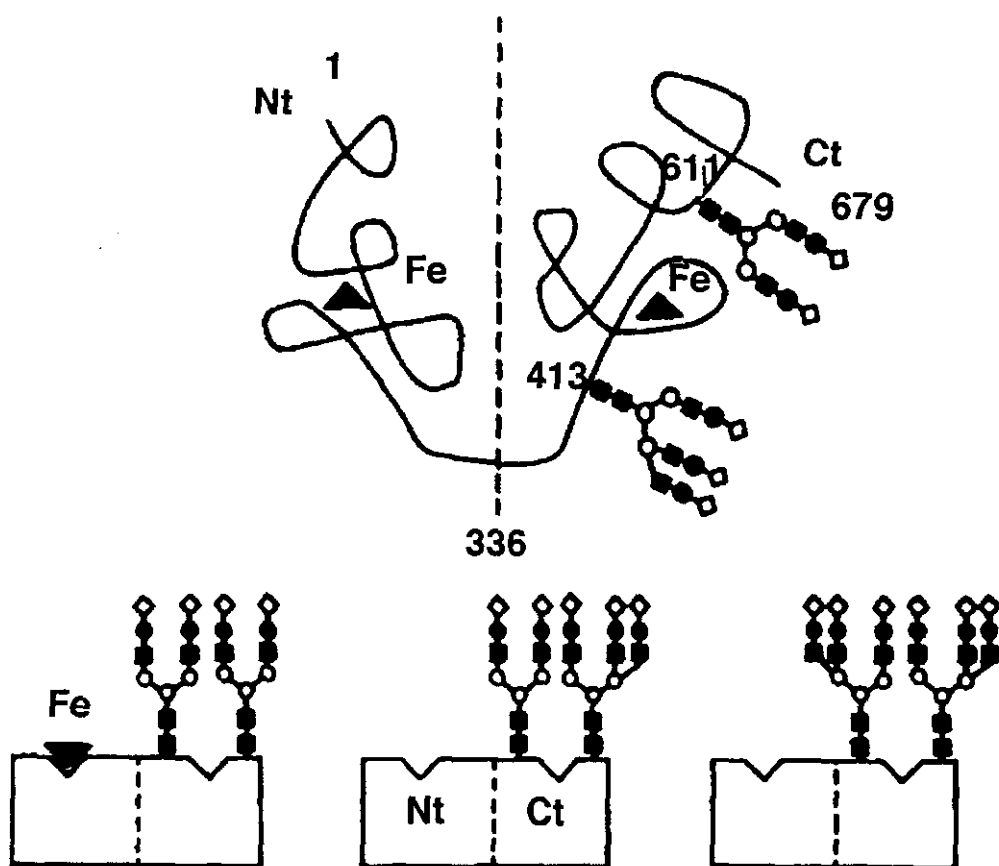
La transferrina sérica es una glicoproteína codificada en el cromosoma 3 (37). Tiene un Peso molecular de 80 KD. Esta constituida por una cadena de 679 aminoácidos. Su punto isoeléctrico es de 5,6 a 5,9 y presenta una movilidad electroforética beta (figura 2).

La heterogeneidad de estructuras que presenta la transferrina se debe a.

- Variaciones en la secuencia polipeptídica
- Diferente contenido de hierro (apotransferrina, transferrina monoférrica y diférrica).
- Diferencias en la estructura de la cadena de N glicanos.

Las implicaciones fisiológicas de esta diversidad química no estan claras. Se detecta diferente complejidad de sialización en el embarazo, la deficiencia de hierro, la enfermedades malignas, la artritis reumatoide, el cáncer y el alcoholismo.

Figura 2. Estructura de la transferrina



b) Unión del hierro a la transferrina:

El hierro que está unido a la transferrina está en estado +3, y adopta una configuración octaédrica (38). Cuatro de sus ligandos son aminoácidos, dos residuos de tirosina, un de histidina y otro de aspartato. El quinto ligando es un ión bicarbonato que se une también a un resto de arginina. El sexto es una molécula de agua. El anión bicarbonato cierra el lugar de unión del hierro a la proteína y sirve de puente entre los dos. La constante de disociación de la transferrina por el hierro es alta a pH fisiológico $K_a=10^{20} M^{-1}$. Esta constante de afinidad disminuye de manera drástica a pH ácido, lo cual como veremos favorece la liberación del hierro transportado por la transferrina en el interior celular.

La transferrina posee dos dominios con capacidad de unión reversible al hierro (39). Ambas tienen un 40% de homología en su secuencia de aminoácidos. El primero lo constituyen los aminoácidos del 1 al 336 y el segundo del 337 al 679. Por lo tanto pueden existir en plasma apotransferrina, transferrina monoférrica y diférrica. La proporción de estas es predecible en función de la sideremia y de la concentración de transferrina (8).

La cantidad de hierro que entra en las células depende del número de receptores de transferrina que presenten en su membrana y de la concentración de transferrina diférrica, monoférrica y apotransferrina (9).

c) Otras funciones de la transferrina:

Existen otras células, además de las hepáticas, con capacidad para sintetizar esta molécula (34). En ratas se ha detectado secreción de transferrina en cerebro, corazón, músculo, testículos, glándulas mamarias, timo, linfocitos y macrófagos. Esta transferrina podría cumplir un papel de transporte de hierro paracrino o endocrino en determinados tejidos relativamente aislados del torrente sanguíneo como el cerebro y los testículos.

Se ha propuesto que la transferrina disminuye la susceptibilidad a determinadas infecciones. In vitro se ha demostrado que inhibe el crecimiento bacteriano (34). Sin embargo en pacientes con sobrecarga, en los que la transferrina circulante no es suficiente para vehicular todo el hierro sanguíneo, las infecciones no son causa de mortalidad importante (40).

En pacientes con atranferrinemia se pueden detectar pequeñas cantidades de transferrina en el torrente sanguíneo. Esto sugiere que la atranferrinemia completa es incompatible con la vida.

1.3.3. PASO AL INTERIOR CELULAR: EL RECEPTOR DE LA TRANSFERRINA.

El proceso de paso del hierro a las células está mediado por el receptor de la transferrina (41, 42, 43, 44). La unión de la transferrina a su receptor celular es de tipo específico ligando receptor.

a) Distribución orgánica del receptor:

Las células con mayor demanda de hierro son las que sintetizan hemoglobina, la placenta y las células de división rápida, que son las que tienen mayor cantidad de receptores de transferrina en sus membranas.

-Los precursores eritroides: En condiciones normales estas células tienen el 80% de los receptores del cuerpo. Esta proporción es aún mayor cuando esta estimulada la eritropoyesis (45). Durante la maduración y proliferación celular de la serie roja en médula el número de receptores de la membrana no es constante. Las células indiferenciadas tienen un bajo número de receptores, que va aumentando progresivamente hasta el estadio de normoblasto donde se detectan 800.000 receptores por célula. Luego disminuyen a 100.000 en el reticulocito (que tiene todavía capacidad de síntesis de hemoglobina), y desaparecen totalmente en el glóbulo rojo maduro (46). Esta evolución corresponde a la necesidad de hierro de cada estadio. En las fases iniciales atiende al proceso de proliferación celular. En las etapas intermedias también influye la función de síntesis de hemoglobina (figura 3).

-El hígado es otro órgano con cantidades considerables de receptor. Actúa como lugar de reserva orgánica del hierro. Pero además lo necesita por la amplia dotación enzimática de los hepatocitos. Cada célula hepática tiene entre 20.000 y 50.000 receptores (47), aunque esta cantidad disminuye drásticamente en estados de sobrecarga (48).

-En el transcurso del embarazo la placenta tiene una cantidad progresivamente mayor de receptores para cubrir los requerimientos del desarrollo fetal y almacenar una reserva de hierro para los primeros meses de vida (49).

Se han detectado también altas concentraciones de receptor en los linfocitos estimulados pero no en los no estimulados (50).

En la membrana de las células tumorales también se encuentra un elevado número de receptores (51, 52), debido al consumo elevado de hierro para la multiplicación celular. El catión formará parte de las estructuras enzimáticas de las nuevas células generadas. Este hallazgo ha conllevado el desarrollo de estudios en oncología, en busca de compuestos específicos que bloqueen el receptor o que actúen contra las células que lo expresan en sus membranas (53).

b) Estructura del receptor de la transferrina celular:

El receptor de la transferrina es una proteína transmembrana de 190 KD constituida por dos cadenas de aminoácidos de 95 KD. Ambas permanecen unidas por dos puentes disulfuro que están situados en el dominio extracelular pero cercanos a la membrana. Cada cadena tiene un dominio citoplasmático de 61 aminoácidos que corresponde (a diferencia de la mayoría de los receptores de membrana) al segmento N-terminal, un dominio transmembrana de 28 aminoácidos, y un dominio extracelular de 671 aminoácidos que corresponde al segmento C-terminal (54, 55). El dominio intracelular está intimamente implicado en el proceso de internalización del complejo Fe-transferrina-receptor (56) y formación de vesículas (57). El dominio extracelular está implicado en la unión específica del receptor a la transferrina y en la afinidad por la misma (58, 59 60). El gen que codifica al receptor de la transferrina se encuentra en el cromosoma 3, en la misma región donde se localiza al gen de la transferrina (61). La síntesis completa de la proteína implica también modificaciones postranscripcionales. Como consecuencia la estructura final, el receptor de la transferrina presenta tres cadenas de oligosacáridos, acilaciones que favorecen la unión covalente a ácidos grasos, y fosforilaciones. Los hidratos de carbono representan el 5% del peso molecular de la transferrina (figura 4).

Figura 3. Expresión del sTfR en los distintos estadios de maduración de la serie roja

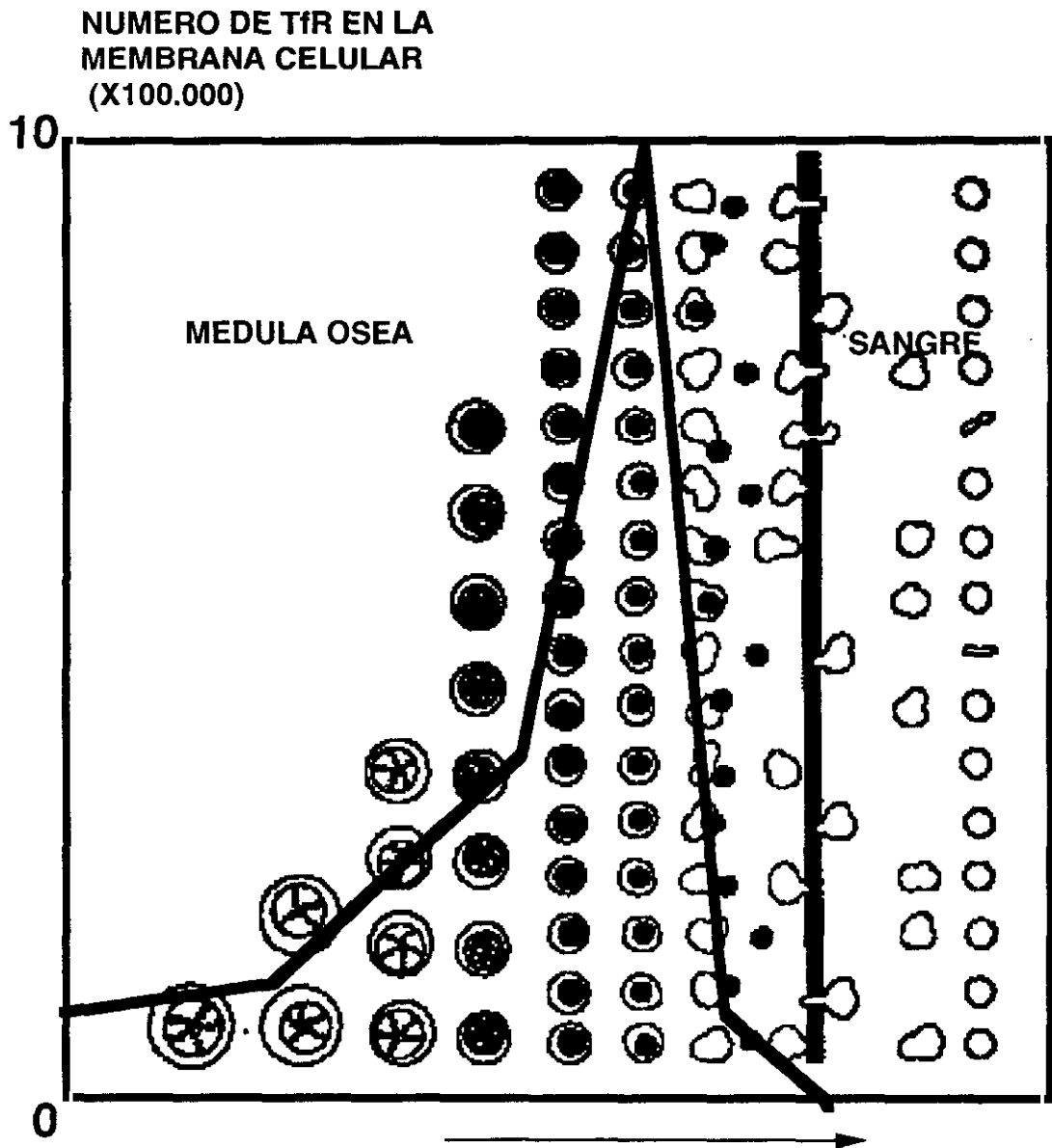
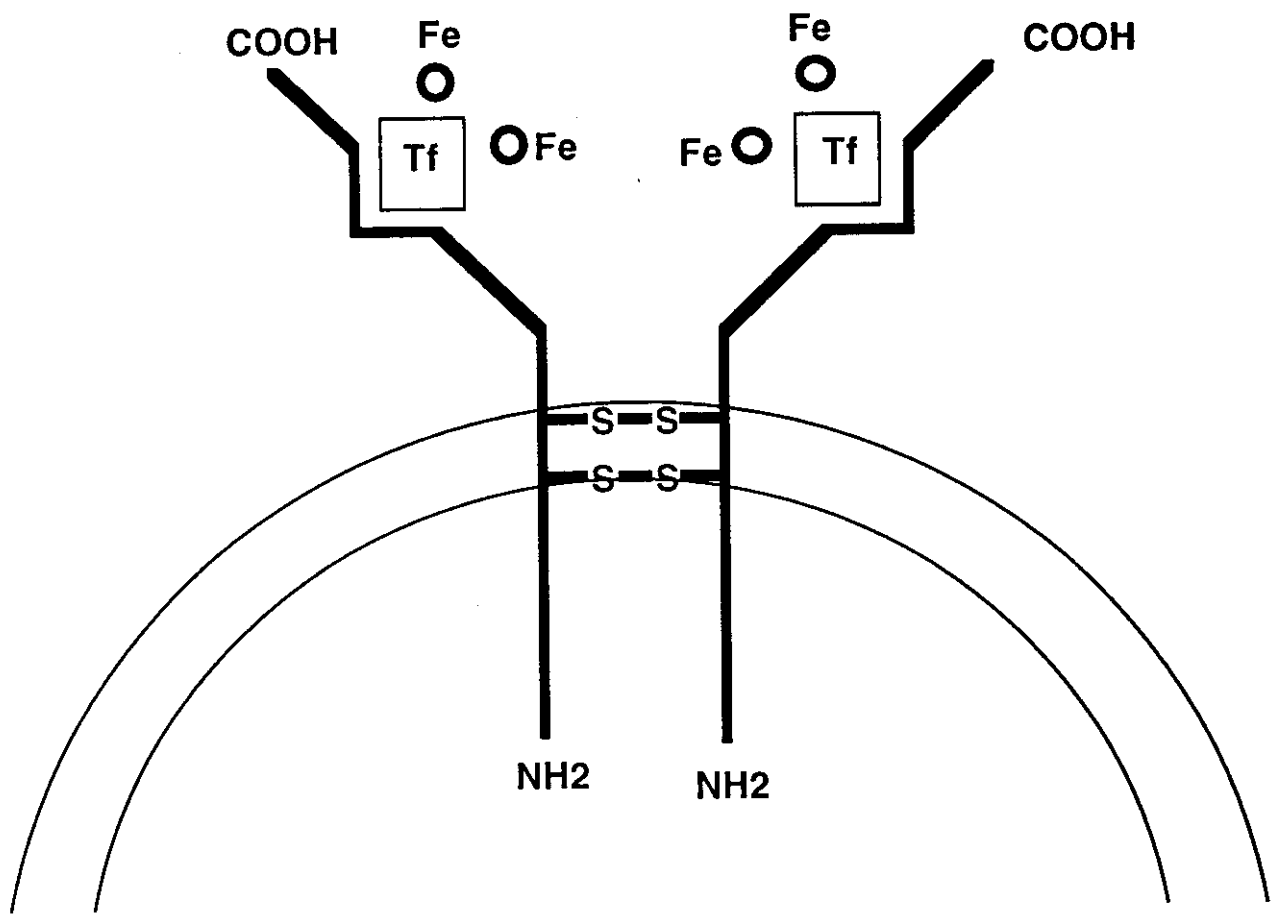


Figura 4. Estructura del receptor de la transferrina (TfR)



c) El mecanismo de paso:

Cada receptor de transferrina puede unirse a una o dos moléculas de transferrina. Como ya hemos explicado en sangre hay apotransferrina, transferrina monoférrica y transferrina diférrica. A pH fisiológico la afinidad hacia la transferrina diférrica es alta, para la monoférrica intermedia y para la apotransferrina baja (58, 60). Una vez que se ha unido la transferrina a su receptor la membrana se invagina y se recubre de clatrina (62). Finalmente se forma una vesícula endocítica o endosoma, que se separa de la membrana y se interna en la célula (63). El interior de esta vesícula se va acidificando en un proceso dependiente de energía. A pH ácido la afinidad del hierro por la transferrina es muy baja y este se libera (64, 65) para poder ser utilizado por la célula. El complejo transferrina receptor, a diferencia de lo que pasa con otros complejos ligando receptor internalizados, no es digerido por enzimas intracelulares líticas. Ello es en parte gracias a que el complejo apotransferrina receptor es muy estable a pH ácido (66, 67). Finalmente la vesícula se aproxima a la membrana celular por una ruta paraloggi y se fusiona con la misma (68). En el exterior celular, el pH neutro favorece la liberación de la apotransferrina, ya que esta tiene poca afinidad por el receptor (67).

Cada ciclo dura entre 3 y 16 minutos (45), y a su término se reciclan tanto la transferrina como su receptor (figura 5).

d) Control del paso de hierro al interior celular: Regulación del número de receptores de transferrina en la membrana.

La demanda de hierro en las células depende de los siguientes factores:

- La función que estas cumplan en el organismo (41). En el caso de los precursores eritroides la demanda es alta, pues deben sintetizar la hemoglobina que heredarán sus células hijas, los hematíes maduros.
- La mayor o menor cantidad de hierro que tenga la célula (69).
- Su actividad proliferativa (70). Las células que están multiplicándose necesitan recargar su arsenal férrico para que lo hereden las células hijas.

La magnitud del flujo de hierro al interior celular es función del número de receptores de transferrina que están presentes en la membrana celular (71).

Las células con mayores requerimientos del metal tienen mayor número de receptores de transferrina en su membrana (46).

Se puede hablar de dos tipos de tejidos diferenciados en función del tipo de control que ejercen sobre el número de receptores de transferrina en su membrana celular:

-Tejidos constituidos por células no proliferantes, como las neuronas y las células musculares estriadas. Poseen receptores de transferrina que permiten el aporte de hierro para sus funciones y almacenamiento tisular.

-Otros tejidos con células altamente proliferativas que expresan de forma variable los receptores de transferrina atendiendo a sus necesidades metabólicas : eritroblastos, células trofoblásticas, hepatocitos, linfocitos y células tumorales. En este último caso el número de receptores de transferrina de la membrana celular está regulado a varios niveles:

El control más importante y conocido es a nivel transcripcional (72). En el extremo 3' del RNAm de ferritina y en el 5' del receptor de la transferrina se encuentran unas secuencias denominadas iron responsive elements IRE (73). Son sensibles a una proteína que se ha llamado iron responsive element binding protein IRE-BP, que tiene actividad aconitasa (74). Cuando el contenido celular de hierro es alto y por mediación de un pool regulador de hierro, esta proteína está en su forma activa (4Fe-4S) y degrada la secuencia de RNAm que codifica al receptor de la transferrina (75). En este estado los IRE-BP no tienen acción sobre el RNAm de la ferritina. Pero si el contenido celular de hierro es bajo, la proteína está en su forma inactiva (3Fe-4S), lo que hace que se una a los IRE del RNAm del receptor de la transferrina evitando su degradación. Con esta configuración los IRE tienen mayor afinidad por el RNAm de la ferritina, y la unión impide la transducción de esta (69, 76). La actividad de los IRE-BP parece estar modulada por cambios en los niveles celulares de óxido nítrico y esto a su vez responde a la concentración celular de hierro (figura 6). La regulación de la expresión del receptor de la transferrina y la ferritina presenta diferencias sustanciales en el sistema mononuclear fagocítico SMF (77).

Figura 5. El ciclo celular del TfR

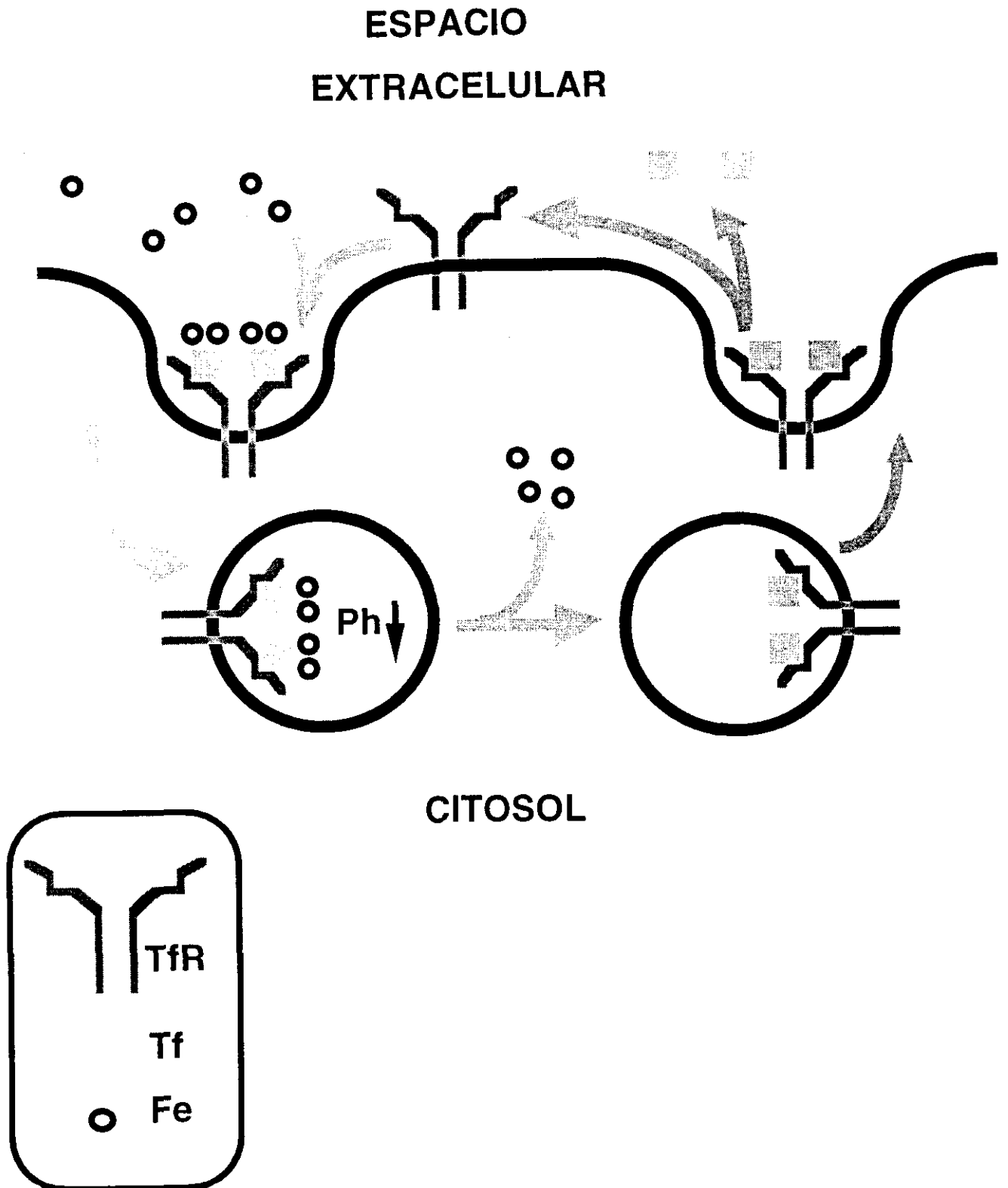
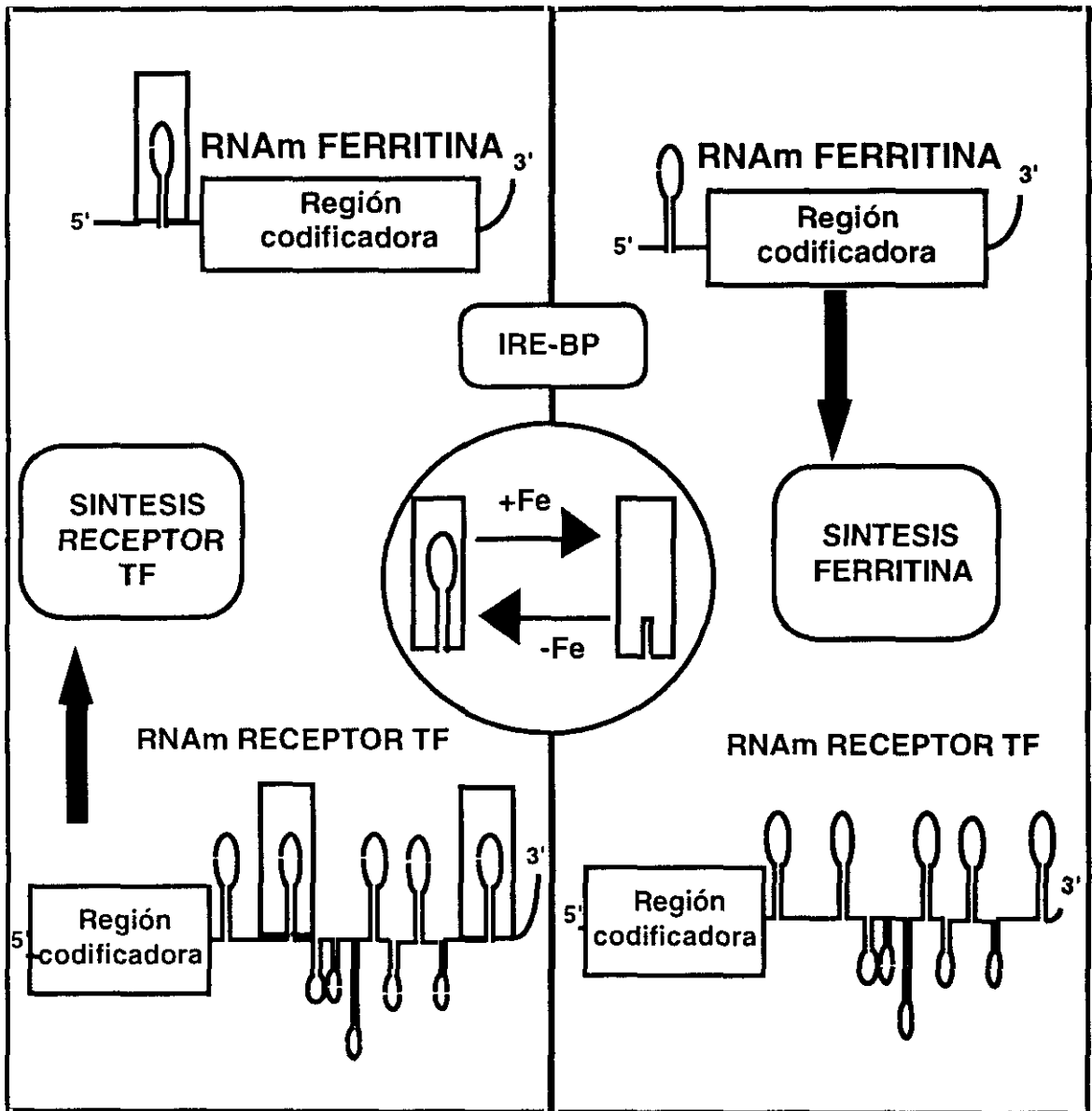


Figura 6. Control de la expresión del TfR



También a nivel transcripcional parece existir un control de la síntesis del receptor que está en función del grado de proliferación celular. Por ello existen diferencias en la expresión del receptor en diferentes etapas del ciclo celular (78).

La distribución celular del receptor también influye en la cantidad de molécula que se encuentra en la membrana. La tercera parte del receptor de la transferrina celular está a este nivel. El resto se sitúa en el interior, formando parte de vesículas o endosomas (79). La modulación de este reparto puede estar implicada en la regulación del número de receptores de transferrina presentes en la membrana celular (80, 81). De hecho se encuentran muchos más receptores en la membrana en la fase S del ciclo celular que en la fase G2 (82).

El número de receptores está condicionado por otros estímulos, pero su implicación en la regulación de la expresión no es conocida: las concentraciones extracelulares de eritropoyetina (83), ferritina (84), interleuquina 1 alfa y factor de necrosis tumoral (85) y de quelantes de hierro (86).

1.3.4. MOVIMIENTO INTRACELULAR DE HIERRO

El hierro viaja por el interior de las células por rutas poco conocidas. Algunos autores han propuesto al grupo heme como principal lanzadera intracelular de hierro (87). Otros han estudiado el papel del ATP (88).

Un lugar importante al que debe dirigirse el oligoelemento en la célula es la mitocondria donde se asocia al grupo heme. En esta organela se han caracterizado receptores para complejos AMP-hierro y ATP hierro. Los primeros parecen más efectivos que los segundos en el aporte de hierro (89). También se ha sugerido que el metal podría acceder a la mitocondria por fusión de su membrana con la de las vesículas que contienen el complejo hierro - transferrina - receptor, aunque esto no ha podido ser demostrado (15). Algunos estudios han detectado un flujo rápido de hierro entre el ATP y dos familias de proteínas cuyo papel es incierto (88).

1.3.5. DEPÓSITO DE HIERRO: FERRITINA Y HEMOSIDERINA:

En el organismo hay un compartimento de depósito de hierro para atender la demanda de células y tejidos. La molécula que cumple esta misión es la ferritina intracelular. Bajo condiciones fisiológicas más del 50% del hierro en depósito se encuentra en la ferritina (11, 90). Esta molécula es un almacén de hierro movilizable que además protege a la célula del daño oxidativo producido por el hierro libre.

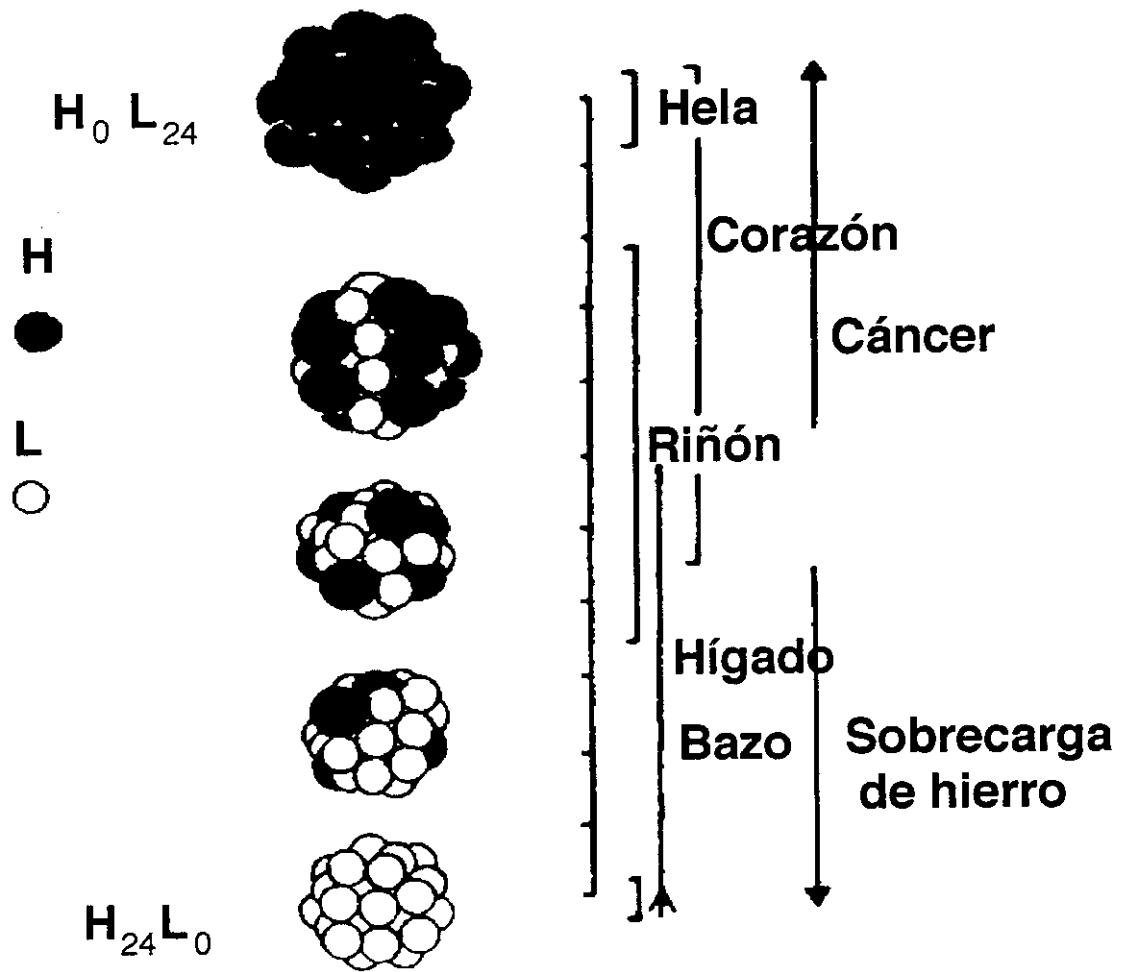
a) Distribución orgánica de la ferritina:

La mayoría de las células del organismo tienen ferritina, pero su concentración es mayor en el parénquima y el sistema retículo endotelial del hígado y en los macrófagos del bazo y la médula ósea. El metal almacenado en la ferritina hepática procede de la transferrina, y en menor medida de los complejos hemoglobina haptoglobina y heme-hemopexina. El depósito del sistema retículo endotelial procede de la depuración de los hematíes viejos.

b) Estructura de la ferritina:

La ferritina es una proteína constituida por 4 subunidades monoméricas que se disponen formando una esfera de 12 nm de diámetro con una cavidad hueca en su interior de 7,5 nm (90). Cada subunidad tiene un peso de 20 KD y puede ser de dos tipos: L y H. Las subunidades L tienen 174 aminoácidos y el gen que las codifica se encuentra en el cromosoma 19. Las subunidades H tienen 178 aminoácidos, están codificadas en el cromosoma 11 y son más ácidas que las L. Ambas subunidades presentan un 55% de homología estructural. Las posibles combinaciones entre las cadenas L y H originan distintas isoferritinas. Estas se encuentran de manera específica en distintas especies, distintos tejidos y aparecen en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas (figura 7).

Figura 7. Estructura de la ferritina



c) Entrada, depósito y salida de hierro en la molécula:

Cada molécula de ferritina es capaz de almacenar 4.500 átomos de hierro y su contenido varía en función de la cantidad de metal que tenga la célula. El proceso comienza cuando el ión ferroso entra en contacto con los lugares de unión específicos de las subunidades L y H que catalizan la oxidación a férrico. Posteriormente pasa a través de los poros de 0,5 nm de diámetro que dejan entre sí las subunidades L y H, hacia el interior. En este viaje es progresivamente hidrolizado y finalmente se deposita en el interior en forma de hidróxido férrico (91). Una vez que se ha formado un core o núcleo suficientemente grande de hidróxido férrico, este facilita por sí mismo la oxidación del catión que entra posteriormente. El segundo mecanismo de oxidación y depósito es más rápido que el primero.

La molécula de ferritina tiene también capacidad para ceder hierro a la célula. Este proceso in vitro se ve favorecido por agentes reductores como ditionato o flavinas (92), por la disminución del pH (93), y por los radicales libres en situaciones patológicas (94). Se sugiere que la liberación del hierro podría ocurrir favorecida por el pH ácido lisosomal.

d) Síntesis de ferritina:

La síntesis de la ferritina está regulada por el contenido de hierro de la célula a nivel transcripcional y transduccional (95). Su concentración aumenta en los procesos inflamatorios (96), y en respuesta al factor de necrosis tumoral alfa (97). La proteína se degrada y se sintetiza continuamente.

e) Otras funciones de la ferritina:

Las funciones más conocidas de la ferritina son el almacén movilizable de hierro, la regulación de la absorción intestinal, y su capacidad para impedir la toxicidad radicalaria del hierro libre (98). La existencia de receptor de ferritina en algunos tipos de células ha hecho pensar que esta proteína puede cumplir otras funciones (99, 100). Se ha propuesto como molécula detoxificadora de metales pesados (101). También se la ha relacionado con la regulación de la mielopoiesis (102) y con la inmunosupresión (103, 104). En todo caso los resultados de los estudios son controvertidos.

Se ha detectado ferritina glicosilada en la leche materna y el calostro. También hay pequeñas cantidades en suero, cuya concentración refleja el estado de los depósitos corporales de hierro. La función que desempeñan estas ferritinas también es incierta.

f) Degradación de la ferritina: la hemosiderina.

La ferritina se encuentra en el citoplasma celular. Pero puede pasar a los lisosomas que al digerirla forman a partir de ella estructuras paracrystalinas peor definidas, constituidas en un 50 % por agregados insolubles de hierro no movilizable y restos orgánicos de lípidos, fosfatos y péptidos. Estas estructuras constituyen la hemosiderina (105). Los agregados pueden teñirse con azul de Prusia y visualizarse al microscopio. La cantidad de hemosiderina de la célula y la proporción ferritina/hemosiderina de la misma aumenta en proporción a la cantidad de hierro celular (106). La hemosiderina parece preservar a la célula de los efectos nocivos del hierro libre en situaciones de sobrecarga (107), pero a diferencia de la ferritina el hierro que contiene no es movilizable.

1.3.6. PÉRDIDAS FISIOLÓGICAS DE HIERRO:

En situaciones normales se pierde 1 mg diario de hierro por descamación de las células de la mucosa intestinal y de la piel, y por eliminación en intestino, riñón y piel. El proceso no está sujeto a regulación. En la menstruación, la pérdidas de de hierro aumentan aproximadamente 1 mg de hierro al día.

1.3.7. NECESIDADES ORGÁNICAS DE HIERRO:

Dependen de la edad y el sexo de la persona. Las necesidades de hierro de varón adulto sano son de aproximadamente 1 miligramo de hierro diario para reponer las pérdidas fisiológicas. Sin embargo existen situaciones fisiológicas y procesos patológicos que modifican los requerimientos diarios. Estas pueden afectar a la demanda orgánica de hierro o a las pérdidas.

En la mujer durante la menstruación las necesidades están incrementadas en 1 miligramo diario de hierro (12). En el segundo y tercer trimestre del embarazo los requerimientos fetales suponen una demanda de hierro para la madre de 4 a 6 miligramos diarios. Las necesidades también aumentan en la lactancia y durante el crecimiento de los adolescentes (108).

Los procesos patológicos que conllevan pérdida de sangre suponen pérdida de hierro orgánico y aumento de su demanda. En los estados de sobrecarga obviamente la aportación de hierro está más que cubierta.

1.4. Anemia ferropénica.

Esta anemia es el estadio final de un balance negativo de hierro en el organismo (109).

a) Causas de la pérdida de hierro:

Entre el 12% y el 30% de la población de los países subdesarrollados tiene anemia ferropénica (110, 111). Sus causas fundamentales son la nutrición deficiente y las enfermedades parasitarias.

En los países desarrollados la anemia ferropénica es mucho menos frecuente. Las causas principales en este caso son:

- Aumento de las necesidades de hierro, en situaciones fisiológicas como el embarazo, la lactancia y la adolescencia.

- Pérdidas de sangre progresiva:

En las mujeres con anemia ferropénica la causa más frecuente son las hemorragias uterinas (112).

Las mujeres tienen un riesgo mucho mayor que los hombres a tener deficiencia de hierro. La prevalencia de anemia ferropénica entre varones de 20 a 50 años es sólo de un 0,2%. Entre mujeres de la misma edad está cercana al 2,9%, debido a las pérdidas menstruales y al aumento de las necesidades durante el embarazo y la lactancia. Un 20% de las mujeres en edad fértil tienen las reservas agotadas. Por encima de los 50 años y tras la menopausia las cifras de prevalencia de la deficiencia son similares en los dos sexos.

En los hombres con anemia ferropénica es habitual la presencia subyacente de úlceras u otros procesos en el tracto digestivo (algunos de carácter maligno) que conllevan pérdidas continuas de sangre (113).

Las donaciones de sangre periódicas pueden llegar a vaciar los depósitos (114, 115).

Grandes marchas o carreras en atletas y militares provocan la destrucción mecánica de glóbulos rojos, lo que origina finalmente pérdidas de hierro (116).

El tratamiento prolongado con antiinflamatorios no esteroideos puede provocar úlceras gástricas y duodenales (117).

La absorción deficiente de hierro debido a alteraciones en el tracto digestivo como la gastrectomía, la enfermedad celiaca o la enfermedad inflamatoria intestinal puede ser también el origen de una anemia ferropénica (109).

b) Los estadios de la pérdida de hierro:

La disminución progresiva del metal afecta de manera secuencial a los distintos compartimentos férricos del organismo (118, 119). Se diferencian los siguientes estadios

- Deficiencia de hierro con eritropoyesis conservada o ferropenia latente. La deficiencia se circunscribe únicamente al compartimento de depósito. No hay repercusión en los compartimentos funcional y de transporte.

- Ferropenia funcional: La deficiencia afecta a los compartimentos de depósito, transporte y lo que es más importante, al compartimento funcional. Se origina una eritropoyesis deficiente en hierro, y los hematíes liberados a la circulación son pequeños, y están cargados con poca hemoglobina (120). Se observa una disminución progresiva de las cifras de hemoglobina.

- Anemia ferropénica. Las tasas de hemoglobina están por debajo de 13 g/dl en hombres, 12 g/dl en mujeres y 11 g/dl en embarazadas, y comprometen la oxigenación tisular.

c) Fisiopatología de la deficiencia de hierro:

El problema más importante de la deficiencia de hierro es el síndrome anémico, y la consiguiente falta de oxigenación del organismo (109). Sus síntomas más característicos son debilidad, palidez, mareos y taquicardia. Pero también se producen otras alteraciones:

- Alteraciones de la conducta. Pueden ser producto de cambios bioquímicos y concretamente del aumento de la concentración de las catecolaminas.

- Disfunción muscular y acidosis láctica en animales.

- Alteraciones del desarrollo fetal de ratas.
- Aumento de la sensibilidad al frío debido a un empeoramiento de la termogénesis, con una producción insuficiente de triiodotironina.
- Afectación del metabolismo hepático de drogas y fármacos al decrecer la actividad del citocromo P-450.
- Disminución de la respuesta inmune por linfocitos y neutrófilos. Sin embargo no se ha conseguido relacionar la deficiencia de hierro y la susceptibilidad a la infección.
- Aumento de la absorción de metales pesados potencialmente tóxicos.

Al diagnóstico de una anemia ferropénica debe seguir la identificación de la causa de la deplección de los depósitos de hierro, y el tratamiento correcto de la misma. El tratamiento de la ferropenia con suplementos de hierro, debe prolongarse hasta la reposición de las reservas de hierro.

1.5. Anemia de los trastornos crónicos (ATC):

La anemia de los trastornos crónicos fué descrita inicialmente por Cartwright (121), y estudiada también por otros autores en los años 80. Es una anemia que se asocia a procesos infecciosos, inflamatorios crónicos, y tumorales (122). Es frecuente en los pacientes hospitalizados. Generalmente tiene un carácter moderado y es asintomática, pero puede ser severa (123).

a) Patogenia de la ATC:

Los mecanismos fisiopatológicos que están implicados en el desarrollo de la anemia de los trastornos crónicos son fundamentalmente alteraciones del metabolismo del hierro, y trastornos de la eritropoyesis:

- El secuestro de hierro en los macrófagos del sistema retículo endotelial:

Causa una eritropoyesis deficiente en hierro (124, 125). En el hombre el 95% del hierro que accede a los eritroblastos de la médula proviene de la hemoglobina procedente de los glóbulos rojos viejos, depurados de la sangre por los macrófagos. En condiciones normales, el hierro de estas células, se puede movilizar, para atender las necesidades férricas de otras, especialmente de los eritroblastos. Se ha demostrado que la disponibilidad

de este hierro de los macrófagos, se encuentra deteriorada en la ATC (126, 127). Existe una deficiencia de hierro, a nivel celular, similar a la de la anemia ferropénica, pero con depósitos normales o incluso elevados (deficiencia funcional). El bloqueo del metal en los macrófagos, no está limitado a la médula sino que también acontece en el tubo digestivo, limitando la absorción (128), y también en los hepatocitos (129). El oligoelemento transportado en la transferrina puede ser, no obstante, utilizado adecuadamente (124, 130, 131).

Se ha implicado a varias citoquinas en esta alteración de la utilización del hierro. La interleuquina 1-B, liberada por los macrófagos, ejerce una acción inhibitoria sobre la proliferación eritroide (132). Pero también favorece la liberación de lactoferrina por parte de los neutrófilos. La lactoferrina captura el hierro de la transferrina, y lo transfiere directamente a los macrófagos (133). Hay autores que no comparten esta teoría. En ratones neutropénicos (y por lo tanto que pueden liberar poca lactoferrina) la administración de interleuquina 1 ocasionó hipoferremia (134). En pacientes neutropénicos y con infección, se detecta también hipoferremia a pesar de la coexistencia de bajos niveles de lactoferrina plasmática (135). En ratones se ha implicado al factor de necrosis tumoral alfa en la hipoferremia de las enfermedades inflamatorias (97).

En la anemia de los trastornos crónicos los niveles de ferritina sérica se elevan, como consecuencia de la citólisis, y en menor medida, del aumento de la ferritina celular (136). En determinados procesos malignos existe una correlación entre la activación de los macrófagos y la ferritinemia (137). El aumento de las concentraciones de esta molécula, disminuye la disponibilidad de hierro para la eritropoyesis.

-Trastornos de la eritropoyesis:

Relacionados con la eritropoyetina:

La eritropoyetina humana es una hormona producida a nivel renal, cuya liberación aumenta en respuesta a la hipoxia tisular, y que estimula la eritropoyesis medular. Algunos estudios han observado que, en pacientes con ATC, existían niveles deficientes de eritropoyetina en relación al grado de anemia (138). Sin embargo en otros trabajos, los niveles de eritropoyetina de los enfermos con ATC, eran similares a los hallados en otras anemias de igual magnitud (122).

El crecimiento *in vitro* de colonias eritroides, es inhibido con el suero procedentes de enfermos con anemia de los trastornos crónicos (139), o con sus macrófagos (140). Por lo tanto, puede existir una respuesta insuficiente de la médula, en relación al grado de estímulo de la eritropoyetina, debido a la presencia de un inhibidor sérico de la actividad de la eritropoyetina. Pero no se ha conseguido identificar a las sustancias inhibidoras, ni en plasma de animales experimentales con inflamación inducida, ni en el suero de pacientes con ATC.

No relacionados con la eritropoyetina:

La eritropoyesis puede estar inhibida por la acción de algunas citoquinas. La interleuquina 1 secretada por los macrófagos inhibe la proliferación eritroide en ratas (132). También se ha propuesto que esan implicados el factor de necrosis tumoral ,y el interferon alfa, en esta disfunción (141). Estos péptidos probablemente inhiben la proliferación de las células progenitoras eritroides en la médula ósea, de manera que se pierde la relación exponencial entre el hematocrito y la eritropoyetina (142).

En pacientes con enfermedades malignas se han detectado alteraciones en las células progenitoras de la serie roja, y en las células germinales de la hematopoyesis. En pacientes con anemia asociada a la artritis reumatoide, se observó una eritropoyesis ineficaz (143).

-Puede existir un acortamiento de la vida de los hematíes, debido a mecanismos extracorpúsculares (121).

Todos estos mecanismos posiblemente esten relacionados en una secuencia de eventos (122). Para cada paciente y para cada patologia, la importancia de cada uno de los trastornos descritos puede ser diferente, de forma que en unos casos, la causa fundamental de la anemia sería una producción de eritropoyetina deficiente, y en otros, un acortamiento de la vida eritrocitaria, o el secuestro drástico del hierro en el sistema reticulo endotelial.

El tratamiento de la ATC es etiológico y sintomático; etiológico porque debe actuar sobre la enfermedad de fondo, y sintomático porque en los casos que el descenso de hemoglobina puede comprometer la vida del paciente, se tiene que recurrir a transfusiones. El futuro de la terapia de estas anemias

pasa por delimitar los factores desencadenantes en cada paciente, y en cada patología para poder actuar sobre ellos.

1.6. Sobrecarga de hierro:

Es un desbalance del metabolismo del metal que puede ser debido a varios trastornos, y que puede producir daño tisular. En primer lugar debemos definir dos situaciones diferentes: la hemosiderosis y la hemocromatosis. La hemosiderosis es un aumento local o general de las reservas férricas tisulares. No implica necesariamente daño tisular, y puede ser consecuencia de una redistribución de hierro orgánico sin aumento de la cantidad total .

La hemocromatosis es la sobrecarga de hierro que lleva asociado daño tisular (144, 145).

a) Etiología:

La sobrecarga puede ser debida a varias causas:

- Incremento de la absorción.
- Alto contenido de hierro en la dieta.
- Trasfusiones de sangre repetidas.
- Anemia con eritropoyesis ineficaz.

b) Patogenia:

En situaciones de balance positivo las células que acumulan mas cantidad de hierro son los macrófagos del sistema reticulo endotelial y las de los parénquimas, fundamentalmente el hepático (146). En una persona sana el hierro se deposita en estos dos tipos de células. La distribución es mas selectiva cuando existen patologías subyacentes (4):

- En pacientes politransfundidos, y en la anemia de los trastornos crónicos, los macrófagos acumulan el hierro en su interior. En el caso de las transfusiones esto es consecuencia de la depuración de los eritrocitos viejos.
- El aumento de la absorción afecta fundamentalmente a las células parequimatosas. Sin embargo en la eritropoyesis ineficaz parte del exceso de hierro absorbido se deposita en los macrófagos

-En la eritropoyesis ineficaz, la hemoglobina liberada por el aborto intramedular, se une a la haptoglobina y se depura en el parénquima hepático. Por lo tanto su contenido de hierro también se acumula allí.

-Cuando la sobrecarga de hierro es duradera existe una redistribución del metal entre el sistema reticuloendotelial y el parénquima.

c) Fisiopatología:

El hierro del organismo se encuentra formando parte de estructuras proteicas en las que su actividad química se encuentra controlada. En situaciones patológicas de sobrecarga, se puede sobrepasar esa capacidad de control, y quedar hierro libre (147, 148). La actividad química del metal libre es tóxica para las estructuras celulares (149), que sufren oxidaciones y daño radicalario (11, 150). Además se detecta una deplección de ácido ascórbico como consecuencia de su oxidación. Ello origina alteraciones del metabolismo del triptófano y osteoporosis.

En los tejidos, la sobrecarga afecta fundamentalmente a los macrófagos, ya a células del parénquima. Los primeros "toleran" mejor la sobrecarga de hierro que las células parenquimatosas.

En la evolución de la sobrecarga influyen dos factores (151):

-La velocidad de acumulación del hierro: Es más rápida en la beta talasemia y más lenta en la hemocromatosis hereditaria. Esto se refleja directamente en el desarrollo de la enfermedad.

-El tipo de célula afectada: La célula del parénquima es más sensible a la sobrecarga de hierro que el macrófago. La misma cantidad de hierro por kg de peso puede tener mayor o menor toxicidad, en función del mayor o menor grado de afectación de las células del parénquima. En los pacientes con aplasia las cantidades tóxicas de hierro se alcanzan con 2 mg/kg ya que este se acumula fundamentalmente en el macrófago. En la talasemia ya hay mayor afectación del parénquima y los niveles tóxicos se alcanzan con 1 mg/kg de hierro. Finalmente en la hemocromatosis hereditaria se detecta daño tisular a partir de 0,2 a 0,4 mg de hierro por kg de peso.

d) Clasificación de la sobrecarga de hierro:

-Hemocromatosis hereditaria (primaria o idiopática) . Es debida a un aumento de la absorción del hierro. La sobrecarga afecta a las células del paréquima.

-Anemias con eritropoyesis ineficaz y médula hiperactiva. Son las talasemias y las anemias sideroblásticas. La sobrecarga es consecuencia tanto de un aumento de la absorción intestinal, como de las múltiples transfusiones que necesita el paciente. Afecta a las células del sistema reticuloendotelial y al paréquima.

-Anemias aplásicas. La sobrecarga es consecuencia de las transfusiones que precisan los pacientes. El hierro se acumula principalmente en los macrófagos.

-Dietas ricas en hierro. Algunas tribus africanas que ingieren brevajes de alcohol, obtenido por la fermentación de maiz en recipientes de hierro. En esta sobrecarga no se descarta que haya un componente genético. El metal se acumula en las células del paréquima.

Las sobrecargas mas frecuentes son la hemocromatosis hereditaria y la hemocromatosis secundaria a eritropotesis ineficaz:

e) Hemocromatosis hereditaria:

Es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva caracterizada por una absorción excesiva de hierro. Se ha demostrado que la enfermedad se debe a una mutación genética (152). El locus del gen implicado se encuentra en el cromosoma 6 y se trasmite ligado al complejo de histiocompatibilidad HLA-A. La recombinación entre ambos genes es rara. Diez de cada cien personas son heterocigotos y uno de cada mil son homocigotos para este gen (153). Los individuos heterocigotos no desarrollan la enfermedad. En los homocigotos hay una sobrecarga progresiva durante la vlda (154) que no afecta a los macrófagos (155). Sólo uno de cada cinco homocigotos desarrollará la enfermedad. La quinta parte de los enfermos son mujeres probablemente debido al efecto protector de la menstruación (146). En muchas de las enfermas las menstruaciones son escasas. El consumo de alcohol aumenta el riesgo de desarrollar la enfermedad en un 50% (151).

El mecanismo concreto responsable de la alteración es desconocido. Se supone que el control que el hierro orgánico ejerce en la absorción está alterado. De hecho los pacientes con sobrecarga de hierro la absorción es normal cuando debería estar disminuida. Y después de las flebotomias se encuentra muy por encima de la respuesta fisiológica esperable.

En los individuos homocigotos el acúmulo de hierro durante la vida es progresivo. La mayoría de los que enferman se diagnostican entre los 40 y 60 años que es cuando se presentan los primeros síntomas clínicos.

La sobrecarga afecta fundamentalmente a los hepatocitos, pero también se acumula hierro en el endotelio y en las células del parénquima del páncreas, células de Leydig, pituitaria y corazón. La clásica tétrada de la hemocromatosis hereditaria es la formada por hepatomegalia, hipogonadismo, piel bronceada y diabetes. A nivel cardíaco se desarrolla insuficiencia cardíaca y arritmia. La cardiomiopatía evoluciona favorablemente con los sangrados periódicos (156). Pero puede ser la causa de muerte de muchos de los pacientes no tratados. En el hígado, aparece una degeneración fibrótica en el espacio portal, que finalmente desencadena cirrosis y hepatocarcinoma. El 30% de los pacientes con síntomas de hemocromatosis hereditaria desarrollan carcinoma hepatocelular (157). El hepatoma es la principal causa de muerte en los enfermos tratados. La afectación de los órganos sexuales produce hipogonadismo, disminución de la libido e impotencia. En el páncreas la sobrecarga conduce a la diabetes. El 70 % de los pacientes cirróticos y el 20% de los pacientes no cirróticos la desarrollan. Otras alteraciones son artritis (158), hipotiroidismo o tirotoxicosis (159) y piel bronceada debido al exceso de melanina.

El diagnóstico previo al desarrollo del daño orgánico permite establecer de manera rápida la terapia, y enlentecer así el desarrollo de la sobrecarga, retrasando o evitando la enfermedad.

El tratamiento consiste en disminuir la cantidad de hierro orgánico, practicando flebotomias de manera periódica. En situaciones de anemia severa o insuficiencia cardíaca, la alternativa son los quelantes de hierro (160, 161).

f) Hemocromatosis secundaria a eritropoyesis ineficaz

Entre las mas frecuentes se encuentran la talasemia mayor y las anemias refractarias como la sideroblástica. La sobrecarga acontece debido a dos procesos que favorecen la acumulación:

-La redistribución del hierro de la sangre transfundida. El flujo del metal se dirige hacia los macrófagos depuradores de hematíes viejos (162).

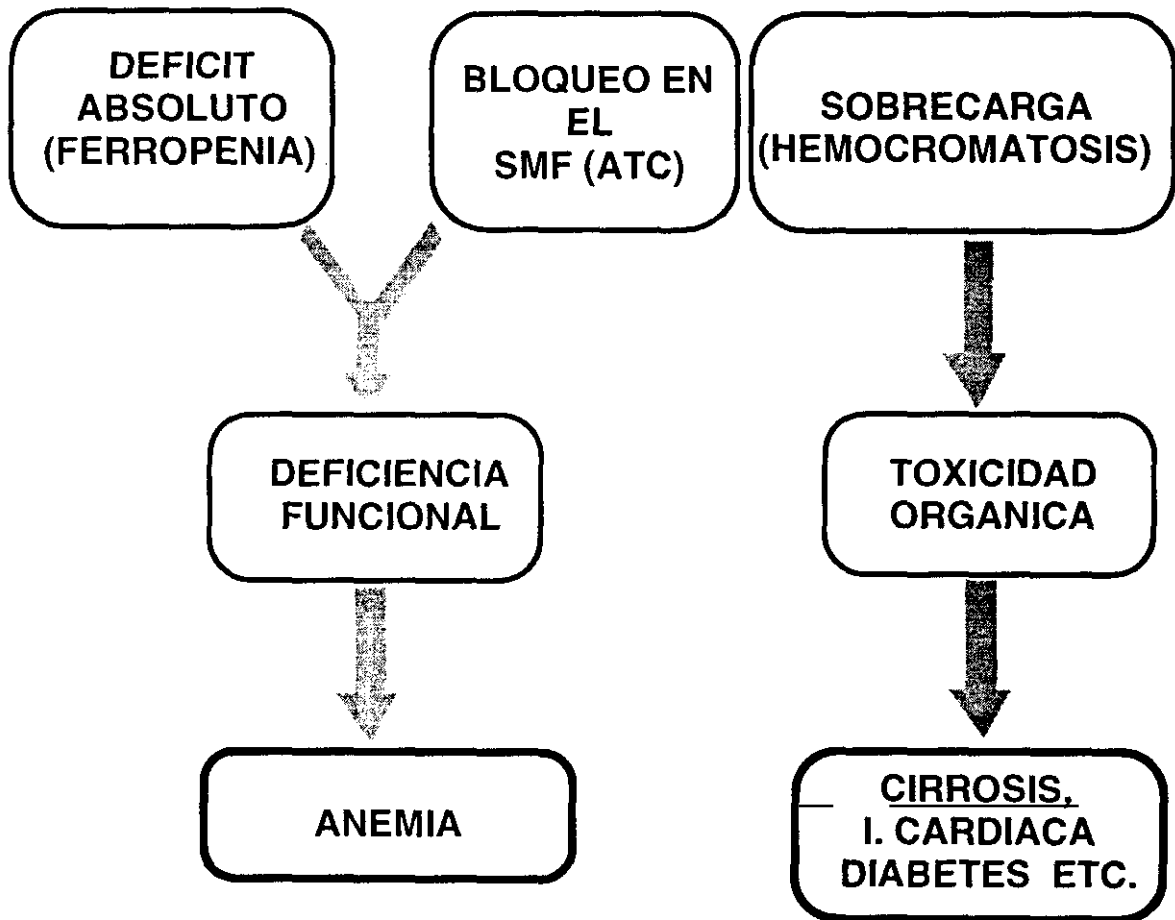
-La hiperplasia eritropoyética aumenta la absorción de hierro (32). Los pacientes con anemias aplásicas no presentan disfunción hepática a pesar de las transfusiones, mientras que los pacientes con anemia refractaria y hiperplasia eritropoyética sí. La sobrecarga de hierro afecta a las células parenquimatosas y a los macrófagos.

Los pacientes con beta talasemia durante la primera década de la vida desarrollan fibrosis hepática, en la segunda década fallo gonadal y en la tercera fallo cardiaco.

El tratamiento adecuado de la hemocromatosis secundaria también es la administración de quelantes de hierro.

Ilustramos un esquema de los desbalances de hierro en la figura 8.

Figura 8. Disbalance de hierro: Patología



2. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL METABOLISMO DEL HIERRO

Existen numerosos parámetros analíticos que aportan información sobre el estado del metabolismo del hierro (163, 164, 165). Abordamos este estudio clasificándolos por compartimentos:

2.1. Exploración por compartimentos:

2.1.1. COMPARTIMENTO FUNCIONAL:

Los autoanalizadores hematológicos actuales utilizan la citometría de flujo para la evaluación de las características de la masa eritrocitaria circulante. El análisis de las células se basa en dos metodologías: la impedancia eléctrica, y los métodos ópticos. El análisis de un gran número de células permite determinar varios parámetros con una óptima exactitud y reproductibilidad. Entre los parámetros que proporciona el hemograma nos interesan los siguientes.

a) La concentración de hemoglobina: Refleja la masa eritrocitaria circulante, salvo en casos de hemoconcentración y hemodilución. Las concentraciones de referencia utilizadas por la Organización Mundial de la Salud para hablar de anemia son 13 g/dl en hombres, 12 g/dl en mujeres y 11 g/dl en embarazadas.

La determinación se realiza por el método clásico de la cianometahemoglobina. El método es sencillo y está bien estandarizado. Tiene una baja variabilidad metodológica y biológica. Se considera cambio significativo de concentración (no debido a la variabilidad analítica) aquel que es superior a 1 g/dl.

b) El número de hematíes por unidad de volumen de sangre: Se eleva en algunos tipos de talasemia y algunas hemoglobinopatías. Está disminuido en la mayoría de las anemias.

c) El volumen corpuscular medio de los hematíes (VCM): Es menor en anemias ferropénicas, talasemias y anemias de los trastornos crónicos. Aumenta en alteraciones de la maduración de la serie roja, como los déficits de vitamina B 12 y ácido fólico, y en las hepatopatías.

d) La hemoglobina corpuscular media (HCM) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) tienen valores bajos cuando se desarrolla una eritropoyesis deficiente en hierro.

2.1.2. COMPARTIMENTO DE DEPÓSITO

Existen varios métodos para su análisis:

a) Flebotomía cuantitativa: Es uno de los métodos más fiables (166), pero es complejo. Consiste en extraer semanalmente medio litro de sangre hasta que el individuo no es capaz de mantener su concentración de hemoglobina, por haber agotado todas las reservas de hierro. En el *cálculo del hierro en depósito inicial* se debe tener en cuenta, la cantidad de hierro absorbido en la dieta durante el programa de sangrados, y la cantidad de hierro que se ha eliminado con las sangrías. Esta última es equivalente al metal que estaba en depósito, y se ha movilizado hacia la médula ósea para mantener las tasas de hemoglobina. Se considera que una bajada en la concentración de hemoglobina de 1 g/dl es equivalente a la pérdida de 160 mg de hierro en depósito.

Esta técnica se utiliza en estudios de investigación y en el tratamiento de algunas sobrecargas de hierro sin anemia. No tiene aplicación en la analítica rutinaria.

b) Determinación de hierro en tejidos de depósito:

Los tejidos más accesibles son el hígado y la médula ósea (167). En general existe una buena correlación entre el hierro en hígado y en médula ósea (168).

Con la biopsia hepática se puede determinar por métodos químicos la cantidad de hierro por unidad de peso. Pero este hierro incluye tanto el compartimento funcional como el compartimento de reserva (169).

La tinción con azul de Prusia de esa misma muestra permite visualizar la cantidad de hemosiderina del tejido. En el resultado de la evaluación microscópica influye la subjetividad del observador y la representatividad de la muestra. La biopsia hepática es fundamental en el diagnóstico de la hemocromatosis hereditaria, y otras sobrecargas de hierro.

El aspirado medular es una muestra más fácil de obtener que la biopsia. Su observación al microscopio con la tinción de Perls permite determinar el estado y disposición de los depósitos de hierro en médula. Es la técnica de

referencia utilizada de manera clásica para evaluar el estado de los depósitos de hierro (170, 171), y para diferenciar la anemia ferropénica de la anemia de los trastornos crónicos. Sin embargo su valoración no refleja *siempre de manera fidedigna los depósitos de hierro* (172). Además a diferencia de la biopsia hepática, no es válida en la exploración de la sobrecarga puesto que aunque el contenido hepático de hierro sea alto, en la médula ósea este puede ser normal.

c) Hierro eliminado en orina en 24 horas después de administrar agentes quelantes de hierro:

La prueba consiste en inyectar por vía intramuscular un agente quelante como la desferroxiamina. Luego se determina la cantidad del hierro eliminado por orina, que estaba acumulado en el parénquima y en el sistema retículo endotelial (167). Esta determinación puede diferenciar si el incremento de la concentración de ferritina y del índice de saturación de la transferrina se debe a una hepatopatía o a una hemocromatosis hereditaria. En la hemocromatosis hereditaria sintomática se eliminan más de 5 mg de hierro en 24 horas y en las hepatopatías se eliminan menos de 3 mg en 24 horas. La eliminación también es baja cuando el exceso de hierro se acumula en los macrófagos como en la anemia de los trastornos crónicos.

El test no detecta ni heterocigotos ni homocigotos que aún no han desarrollado la enfermedad. Tampoco es útil cuando existe deficiencia de vitamina C o insuficiencia renal.

No tiene aplicación en la deficiencia de hierro.

d) Concentración de la ferritina sérica:

La ferritina sérica tiene una estructura similar a la ferritina intracelular, pero está glicosilada. Probablemente se trata de una proteína de excreción. Su función es desconocida. Es rica en cadenas L, e inmunológicamente es similar a la ferritina del hígado y del bazo. Por lo tanto puede proceder de las células del sistema retículo endotelial. Está aumentada en la hemofagocitosis (173). Pero esto no ha podido ser demostrado en cultivos celulares de macrófagos (174).

La determinación de la ferritina sérica es muy útil para la estimación de los depósitos corporales de hierro (25, 173, 175). Existe una buena correlación entre su concentración y los depósitos de hierro calculados por flebotomias.

También existe una relación proporcional entre la concentración de ferritina sérica y el hierro existente en depósito en la médula ósea. Cada $\mu\text{g/dl}$ de ferritina en suero equivale a 8 ó 10 mg de hierro en depósito. Esta correlación se cumple en concentraciones de ferritina entre 15 y 500 $\mu\text{g/l}$.

La cuantificación de la ferritina sérica se realiza mediante técnicas inmunoquímicas como el RIA, el IRMA, el ELISA, y la quimioluminiscencia. La metodología presenta una serie de "condicionantes". El límite de detección de la técnica tiene que ser claramente inferior al punto de corte habitual (aproximadamente 10 $\mu\text{g/l}$) para poder valorar la ausencia de hierro en depósito. El efecto gancho o fenómeno prozona es frecuente. Consiste en que a partir de una determinada concentración de ferritina sérica, la señal que se utiliza para cuantificarla invierte su comportamiento. Se obtienen señales correspondientes a concentraciones mucho menores que la real. La única forma de evitar resultados erróneos por este fenómeno consiste en procesar la muestra al menos en dos diluciones para comparar los resultados. En el suero se puede presentar un efecto matriz. Las proteínas séricas pueden inhibir la unión de la ferritina a los anticuerpos fijados en la fase sólida. El efecto puede soslayarse diluyendo la muestra en tampón y diluyendo los estándares en suero humano (176). Tanto los estándares como las muestras deben diluirse en paralelo en un rango de 1/10. El suero del paciente analizado puede tener antiinmunoglobulinas frente a los anticuerpos de la especie animal que se utiliza en el ensayo. La dilución de estándares y sueros con dicho anticuerpo previene la interferencia en el ensayo. La reproductibilidad normalmente es buena. El peor coeficiente de variación lo tiene el enzimoimmunoensayo. Teniendo en cuenta tanto la variabilidad metodológica como la biológica, el coeficiente de variación intraindividual es de un 15 %. Se recomienda calibrar la técnica con soluciones de ferritina de referencia.

Una concentración de ferritina sérica descendida es un parámetro con un valor predictivo positivo bueno de ferropenia. Pero los valores normales o altos no nos descartan el agotamiento de los depósitos férricos. Esto se debe por un lado a que la síntesis de ferritina está estimulada por las citoquinas en los procesos inflamatorios, y por otro a que la citólisis (especialmente en células hepáticas) libera la ferritina intracelular al espacio extracelular. En este caso la ferritina detectada no es un producto de secreción ni está glicosilada.

En las inflamaciones (177), infecciones (178), hepatopatías, citolisis, lesión tisular, neoplasia, leucemias y linfomas (179) la concentración de ferritina sérica no informa de la cantidad de hierro en depósito. En concreto, en las hepatopatías la ferritina puede aumentar por inflamación, por citolisis y por disminución del aclaramiento de ferritina sérica.

En los casos de sobrecarga de hierro la ferritina se encuentra elevada. Como hemos explicado hay circunstancias diferentes a la sobrecarga que aumentan la concentración de ferritina. Por eso una concentración alta no confirma la sobrecarga, pero unos niveles normales si permiten descartarla. En los casos de sobrecarga la ferritina sérica tiene un contenido férrico mas bajo que en las hepatopatías (180), y presenta una subunidad adicional (181).

La concentración de ferritina no informa de la severidad de la deficiencia en el compartimento funcional. Está mas elevada en el hombre que en la mujer, y en los adultos que en los niños. Por ello hay que establecer un punto de corte adecuado para cada sexo y edad. La detección de la deficiencia mediante la determinación de la ferritina sérica es mas difícil en situaciones en las que sus valores se encuentran mas bajos como el embarazo, la lactancia o la adolescencia.

Se han descrito casos excepcionales en los que la hipoferritinemia se debía a deficiencia de vitamina C, o a hipotiroidismo.

2.1.3. COMPARTIMENTO DE TRANSPORTE:

a) Sideremia:

El hierro del compartimento de transporte representa unicamente un 1 % del hierro corporal. Se intercambia de 10 a 20 veces al día. Por ello la sideremia experimenta grandes fluctuaciones. Está descrita una disminución de sus valores en un 20 a 30% durante la noche. Pero también se producen variaciones entre días en un mismo individuo (182). Esta variabilidad fisiológica se debe tener siempre presente a la hora de interpretar la sideremia y el índice de saturación de la transferrina.

El hierro sérico está disminuido fisiologicamente en mujeres menstruales y en lactantes.

La ICSH aconseja que su determinación se base en una precipitación inicial de proteínas con liberación del hierro de la transferrina en presencia de un agente reductor (183). La centrifugación posterior separa las proteínas desnaturizadas y en el sobrenadante se determina el hierro por la adición

de un cromógeno (bathofenantrolina o ferrozina). Este método evita la absorbancia no específica causada por interferencias de proteínas séricas y por el cobre. Cuando se utiliza sangre anticoagulada con EDTA el método es mas lento y se requieren 15 minutos para la formación del color. Las técnicas *que no requieren centrifugación facilitan la automatización (184)*. En la técnica, se deben controlar las condiciones, para asegurar la liberación rápida y completa del hierro de la transferrina. También se debe conseguir que el hierro liberado esté en forma soluble y no desnaturalice proteínas. *Se necesita utilizar un blanco sin cromógeno para precisar la absorbancia debida a las proteínas séricas.*

La determinación de la sideremia tiene baja variabilidad metodológica, pero alta variabilidad biológica.

-La causas de una sideremia disminuida son:

Situaciones fisiológicas como la segunda mitad del embarazo, la menstruación, la lactancia o la adolescencia.

La deficiencia de hierro.

La anemia de los trastornos crónicos (asociada al bloqueo de hierro en el sistema reticuloendotelial).

-La sideremia se eleva por los siguientes procesos:

Sobreoferta de hierro al plasma: que puede ser exógena o endógena. En el primer caso las causas pueden ser la ferroterapia, las transfusiones, la intoxicación férrica, y la hemocromatosis primaria y secundaria. En el segundo la citolisis, como ocurre en casos de hemólisis, hepatólisis, lisis tumoral (espontánea o por quimioterapia).

Baja utilización del hierro en los tejidos: Eritroblastopenia, anemias megaloblásticas y sideroblásticas.

Poca captación de hierro en el hígado: En las hepatopatías.

Se pueden dar varios procesos al mismo tiempo como en la mielodisplasia y en las talasemias.

Si la sideremia sobrepasa la capacidad de transporte en la transferrina. Aparece hierro no transferrínico que es tóxico por su potencial radicalario.

El hierro en sangre total también puede evaluarse por absorción atómica. En este caso la concentración obtenida es debida tanto al hierro unido a la transferrina como al de la ferritina y la hemoglobina.

b) Capacidad total de transporte de hierro y concentración de transferrina:

Cada molécula de transferrina tiene capacidad para transportar dos átomos de hierro por lo que los dos parámetros están íntimamente relacionados. La capacidad de transporte se mide añadiendo exceso de hierro a la muestra. Se retira el metal que no se ha unido a la transferrina con carbonato magnésico sólido, carbón o resinas de intercambio iónico. Luego se determina su concentración de la forma habitual.

También se puede determinar la capacidad de transporte no saturada de metal, añadiendo al suero hierro radiactivo que ocupa los lugares de transporte de la transferrina libres de hierro. Se mide la radiactividad presente en sobrenadante después del tratamiento de la muestra con carbonato magnésico y centrifugación.

La concentración de transferrina se puede determinar directamente por métodos inmunoquímicos. Los más utilizados son los nefelométricos. Existe una gran variabilidad de resultados entre las diferentes metodologías (185).

Tanto la capacidad de transporte como la concentración de transferrina guardan una relación inversa con los depósitos de hierro. Se elevan en la deficiencia y disminuyen en la sobrecarga y en la anemia de los trastornos crónicos.

Pero los niveles de transferrina y la capacidad total de transporte de hierro también se elevan:

Por mediación de la acción hormonal en el embarazo, en el hiperestrogenismo, el hipertiroidismo, el hipercorticismismo y después de la ingestión de anticonceptivos orales.

En la hipoxia.

En la hepatitis

La concentración de transferrina y la capacidad total de transporte de hierro disminuyen:

Por disregulación negativa: inflamación (asociada a la ATC), hipotiroidismo, hiperandrogenismo.

Por descenso de la capacidad de síntesis de transferrina: hepatopatía, malnutrición, ayuno prolongado y errores genéticos.

Por pérdida de proteínas inespecífica: Nefropatías, enteropatías pierde proteínas, quemaduras.

En anemias megalobásticas, hemólisis y infarto de miocardio agudo.

c) El índice de saturación de la transferrina (IST):

Es el porcentaje de lugares de unión que tiene la transferrina ocupados por el hierro. Se deduce matemáticamente a partir de la sideremia y de la capacidad total de transporte o de la concentración de transferrina. En general las situaciones que aumentan la sideremia, aumentan el índice de saturación. De la misma manera una disminución de la sideremia se suele asociar a una disminución del índice de saturación. Sin embargo la concentración de la transferrina también influye en el valor de este parámetro.

Antes de que se empezara a utilizar la ferritina sérica, se utilizaba este parámetro como el mejor índice de deficiencia. Cuando la saturación de la transferrina es baja hay una aportación pobre de hierro desde el compartimento de transporte a las células que lo necesitan (119). Además hay una baja proporción de transferrina diférrica que es la que tiene una mayor afinidad por el receptor de la transferrina celular. Cuando la saturación de la transferrina está elevada puede existir sobrecarga de hierro. En la hemocromatosis hereditaria la sideremia y la saturación de la transferrina se elevan antes de que lo haga la ferritina sérica, y por lo tanto son más útiles en detectar precozmente la sobrecarga. Si el valor de IST está cercano al 100%, el hierro puede sobrepasar la capacidad total de transporte de la transferrina y hay un riesgo de que parte del hierro no esté unido a la transferrina, y sea tóxico para el organismo (148).

2.1.4. OTROS PARÁMETROS:

a) La protoporfirina eritrocitaria:

Este parámetro explora el compartimento funcional a nivel central. En el pasado su determinación se utilizaba en el diagnóstico de la intoxicación por plomo. Actualmente se ha desarrollado un método para determinar la protoporfirina de zinc mediante hematofluorimetría (186). Pero la protoporfirina eritrocitaria también es un indicador de eritropoyesis deficiente en hierro (187). Esta elevada en la ferropenia, incluso cuando la ferroterapia ya ha comenzado. Sus niveles también se elevan en la ATC (188). Su determinación puede ser útil en la detección de la deficiencia de hierro en niños. La técnica requiere poco tamaño de muestra, pero consume mucho tiempo.

b) Ferritina intraeritrocitaria:

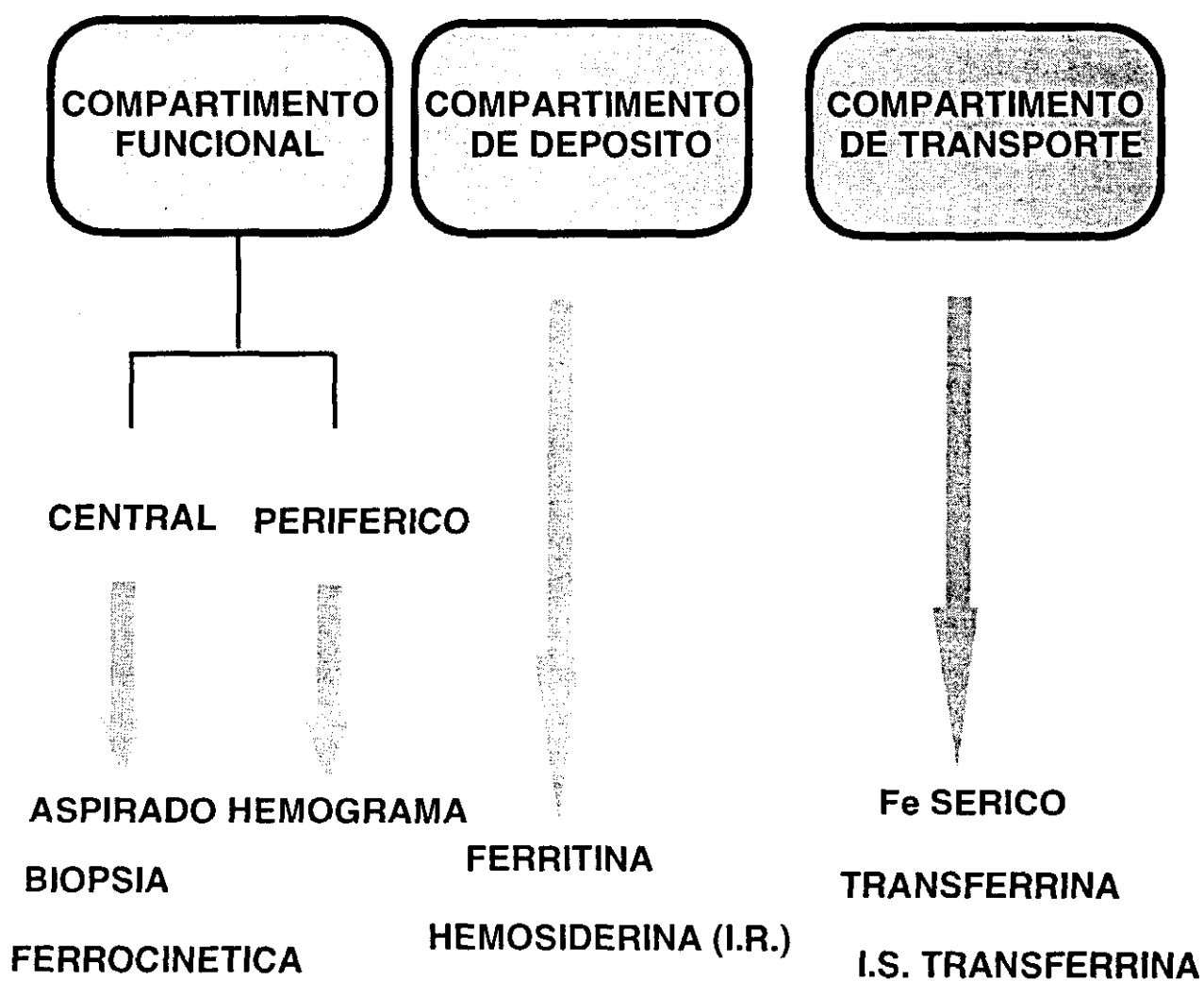
También explora el compartimento funcional a nivel central. El contenido intracelular de ferritina va disminuyendo desde el estadio de eritroblasto hasta el glóbulo rojo maduro. La ferritina intraeritrocitaria refleja la disponibilidad de hierro que tuvo el eritroblasto en la médula (189). Sus valores son bajos en la deficiencia de hierro y en la anemia de los trastornos crónicos. El cociente ferritina sérica / ferritina intraeritrocitaria parece útil para diferenciar ante una ferritina sérica elevada, los homocigotos para el gen de la hemocromatosis hereditaria de la hepatopatía alcohólica (190). Permite también distinguir los heterocigotos de hemocromatosis hereditaria de individuos normales (189). Este cociente también podría aplicarse en el seguimiento del tratamiento de la hemocromatosis hereditaria.

La ferritina intraeritrocitaria también se eleva en talasemias, anemias megaloblásticas y síndromes mielodisplásicos, probablemente debido a la alteración del metabolismo del hierro en estas condiciones.

A pesar de su utilidad, la complejidad metodológica de la determinación limita su utilización como prueba de rutina en el laboratorio.

La figura 9 ilustra un esquema de la exploración del metabolismo del hierro

Figura 9. Exploración del balance de hierro



2.2. Diagnóstico analítico de los desbalances del hierro:

Como se ha visto existen numerosos parámetros que nos informan del estado de los distintos compartimentos del metabolismo de hierro. En el laboratorio clínico la determinación del status férrico se realiza habitualmente con una combinación de pruebas denominada "perfil férrico hemático" (165). Forman parte del mismo:

- El hemograma: Del que se obtiene la hemoglobina, el número de hematíes, el hematocrito, el volumen corpuscular medio, la *hemoglobina corpuscular media*, la *concentración de hemoglobina corpuscular media* y otros índices de distribución de volúmenes y concentraciones de hemoglobina eritrocitarios. Todos ellos reflejan el status férrico en el compartimento funcional.

- La sideremia, la capacidad total de transporte de hierro (o la concentración de transferrina) y el índice de saturación de la transferrina. Son parámetros informativos del compartimento de transporte.

- La concentración de ferritina sérica: informa acerca del estado de los depósitos de hierro.

Vamos a describir como se comportan estos parámetros en las diferentes alteraciones del metabolismo del hierro.

2.2.1. LA ANEMIA FERROPÉNICA:

La anemia ferropénica es el estadio final de la deplección de los depósitos de hierro.

a) Evolución de los parámetros del perfil férrico en el desarrollo de una anemia ferropénica.

En el estadio de deficiencia latente de hierro o deficiencia de hierro con eritropoyesis conservada, el hierro en depósito se ha agotado, y la ferritina está baja. Pero el compartimento de transporte y el compartimento funcional

no están afectados y por lo tanto tampoco lo están el resto de los componentes del perfil. En el estadio de ferropenia funcional la deficiencia de hierro afecta al compartimento funcional y también al compartimento de transporte. No hay un aporte adecuado de hierro a los eritroblastos de la médula ósea. La sideremia y la saturación de la transferrina están bajas. La concentración de transferrina y la capacidad total de transporte en suero se elevan. La eritropoyesis es deficiente en hierro, y ocasiona que los hematíes que salgan a partir de ese momento a la circulación, sean microcíticos e hipocrómicos. Irán disminuyendo progresivamente la hemoglobina, el volumen corpuscular medio y la concentración de hemoglobina corpuscular media. Cuando las tasas de hemoglobina llegan a estar por debajo de los niveles normales, se ha llegado al estadio final, que es la anemia ferropénica.

b) Detección de la deficiencia de hierro

En general en personas sanas la ferritina es el parámetro que define la ferropenia. Los valores bajos de ferritina confirman esta alteración. Pero los valores normales no la descartan.

En el embarazo y la adolescencia concentraciones de ferritina en suero por debajo del rango normal no implican deficiencia de hierro. Numerosos estudios intentan valorar la utilidad de medir la concentración sérica de otros metabolitos para detectar la deficiencia en estas situaciones, como es el caso de la protoporfirina eritrocitaria o el receptor de la transferrina en suero.

c) Determinación del grado de deficiencia

En el desarrollo de la anemia ferropénica, la ferritina refleja el estado de los depósitos de hierro. Pero una vez que los depósitos se han agotado, la ferritina no refleja la severidad de la deficiencia. Los mejores indicadores del grado de deficiencia son los parámetros del compartimento funcional: las tasas de hemoglobina, el volumen corpuscular medio y la concentración de hemoglobina corpuscular media. Otros parámetros que no pertenecen al perfil férrico hemático, pero que también reflejan la magnitud de la deficiencia, son la protoporfirina eritrocitaria y la ferritina intraeritrocitaria.

Todas estas determinaciones tienen una respuesta tardía en la deficiencia y sus valores dependen del estado de la eritropoyesis en los últimos dos o tres meses.

2.2.2. LA ANEMIA DE LOS TRASTORNOS CRÓNICOS:

El bloqueo de hierro en los macrófagos se traduce en una disminución del hierro disponible y por lo tanto de la sideremia y el índice de saturación de la transferrina. La transferrina y la capacidad total de transporte de hierro están disminuidas (a diferencia de lo que ocurre en la ferropenia). Si se llega a desarrollar una eritropoyesis deficiente en hierro, los parámetros que la reflejan también estarán alterados. La ferritina, como es un reactante de fase aguda, no refleja adecuadamente el estado de los depósitos de hierro ni su agotamiento si aconteciera (191). En estas situaciones es difícil distinguir la ATC de la anemia ferropénica, tema que trataremos con más detalle.

2.2.3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE UNA ANEMIA MICROCÍTICA E HIPOCRÓMICA:

Durante la exploración analítica de los pacientes es frecuente la detección de una anemia microcítica e hipocrómica. Se trata normalmente de anemias ferropénicas o ATC. Pero también se detectan casos de talasemia menor. Describimos algunas claves que ayudan al diagnóstico diferencial.

-En el caso de las talasemias hay una síntesis deficiente de las cadenas de globina. En estos casos la anemia es más microcítica que hipocrómica y además hay poliglobulia. La sideremia y el índice de saturación de la transferrina no están disminuidos, a diferencia de lo que ocurre en la anemia ferropénica y en la ATC. En los eritrocitos circulantes es frecuente observar la granulación basófila. Ante la sospecha de talasemia se deben cuantificar las hemoglobinas menores. En concreto en la beta talasemia, que es la más frecuente en nuestro medio, se elevan la hemoglobina A₂. En las delta beta talasemias se eleva la hemoglobina fetal.

-Las alteraciones que se detectan en la anemia ferropénica y en la ATC serán estudiadas con más detalle posteriormente. Se diferencian de las dos alteraciones descritas anteriormente por que tanto la sideremia como el índice de saturación de la transferrina están por debajo de los valores normales.

2.2.4. DIAGNÓSTICO DE LA HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA:

En la hemocromatosis hereditaria, la detección temprana de la alteración permite instaurar la terapia precozmente, o impedir el desarrollo de la lesión tisular. El aumento de la absorción intestinal del hierro produce inicialmente una elevación de la sideremia y del índice de saturación de la transferrina por encima del 70% en mujeres y del 80 %, en hombres. El aumento de la concentración de ferritina en suero ocurre posteriormente. Cuando ya hay daño hepático la ferritina supera la concentración de 700 ng/ml (192).

Las concentraciones de ferritina por encima de 200 ng/ml en mujeres y 300 ng/ml en hombres en ausencia de inflamación, infección, tumores y enfermedades hepáticas, indican aumento del hierro en depósito, que debe ser investigado.

Los parámetros analíticos son orientativos pero el diagnóstico definitivo se basa en la biopsia hepática. El estudio genético de los familiares del paciente permite identificar otros homocigotos y portadores. La determinación del grado de sobrecarga de hierro es útil tanto en el momento del diagnóstico como en la monitorización del tratamiento. Para ello se utilizan los estudios con quelantes de hierro, la determinación de la ferritina sérica y el estudio de la biopsia hepática.

2.2.5. ANALÍTICA PARA EL CONTROL DEL TRATAMIENTO DE LA SOBRECARGA DE HIERRO:

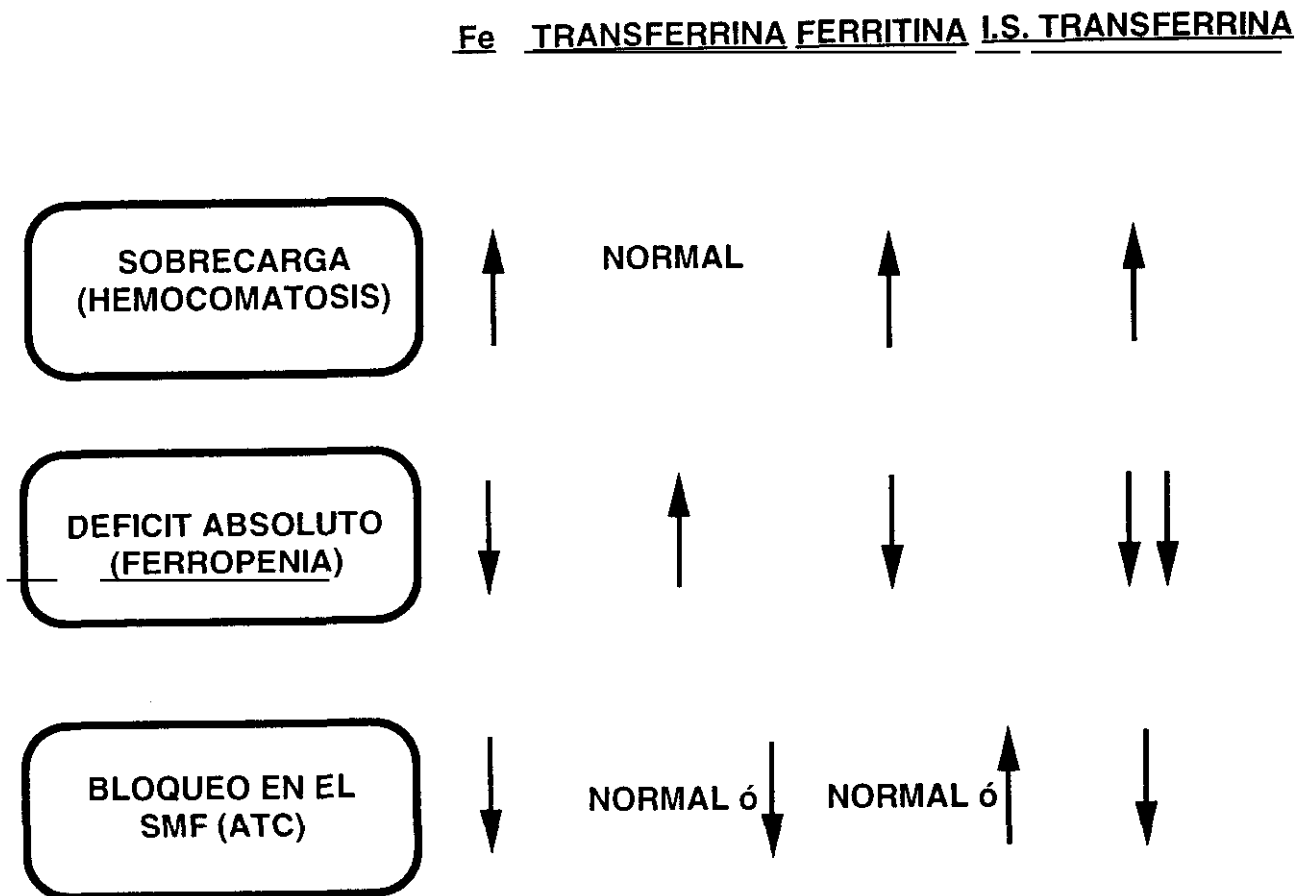
Se debe intentar comenzar el tratamiento antes de que la ferritina llegue a cifras altas y se pretende que el índice de saturación de la transferrina se mantenga por debajo del 60%. Esto disminuirá o al menos retrasará el daño en el parénquima hepático.

El tratamiento de la hemocromatosis hereditaria se monitoriza actualmente con la concentración de ferritina sérica. La terapia de la hemocromatosis secundaria también se puede vigilar con las concentraciones de ferritina en suero (193, 194). Esta debe mantenerse por debajo de 1000 ng/ml.

En cualquier caso, la interpretación de una bajada de la concentración de la ferritina es difícil. Puede ser debida a una disminución del hierro corporal, pero también a una mejora de la función hepática.

El comportamiento del perfil férrico en los desbalances se ilustra en la figura 10.

Figura 10. El perfil férrico en los disbalances



2.3. Limitaciones de las determinaciones del perfil férrico en la delimitación de los desbalances del metal:

2.3.1. LA DIFICULTAD DE DISTINGUIR UNA ANEMIA FERROPÉNICA DE UNA ANEMIA DE LOS TRASTORNOS CRÓNICOS:

En el medio hospitalario la ATC es tan común o más que la anemia ferropénica. Uno de los problemas más frecuentes en el ámbito clínico es distinguir ambas entidades. La necesidad de diferenciarlas estriba en que hay que tratar correctamente la disfunción. En la anemia ferropénica está indicada la administración de hierro. En la anemia de los trastornos crónicos la ferroterapia no corregirá el defecto, y por el contrario puede originar un estado de sobrecarga con afectación orgánica. Se puede recurrir a las transfusiones sólo si está comprometida la vida del paciente. Como ya hemos expuesto la anemia de los trastornos crónicos puede estar desencadenada por diferentes mecanismos. En cada paciente y en cada patología dominan unos sobre otros. La alteración del metabolismo del hierro puede estar más o menos involucrada. Cuando lo está en suficiente medida, origina una deficiencia funcional del hierro. Esta produce una eritropoyesis deficiente en hierro similar a la que se desencadena en la anemia ferropénica. Esto explica el hallazgo de alteraciones analíticas similares a las detectadas en la anemia ferropénica.

- El hierro sérico puede estar disminuido en las dos situaciones, aunque tiende a ser más bajo en la ferropenia
- La concentración de transferrina sérica está aumentada en la ferropenia y normal o disminuida en la ATC.
- La saturación de la transferrina está baja en los dos casos. En la ferropenia esta saturación tiende a estar algo más baja por el incremento de la concentración de la transferrina y la menor sideremia.
- La concentración de ferritina está disminuida en la anemia ferropénica mientras que en los procesos infecciosos, inflamatorios, crónicos, y tumorales, suele estar normal o elevada y no refleja los depósitos orgánicos de hierro. En las hepatopatías la ferritina se libera a la circulación sanguínea por citólisis de las células del parénquima, y también está elevada.
- En algunos casos hay microcitosis e hipocromia en sangre periférica (195).

La historia clínica y la exploración física del paciente, junto con la evaluación global del perfil férrico, permite en muchos casos un diagnóstico correcto. Pero en otras ocasiones la información no es concluyente y hay que recurrir al estudio de médula ósea. Esto implica la realización de una técnica invasiva como es el aspirado medular, y se reserva a los casos en los que es estrictamente necesario.

Se han desarrollado numerosos estudios encaminados a identificar la ferropenia, evitando el estudio medular. La concentración de ferritina sérica se correlaciona en muchos casos con el grado de actividad de la enfermedad crónica o maligna. Basándose en ello algunos autores han pretendido mejorar la información que aporta la concentración de la ferritina intentando soslayar su alteración en algunos procesos:

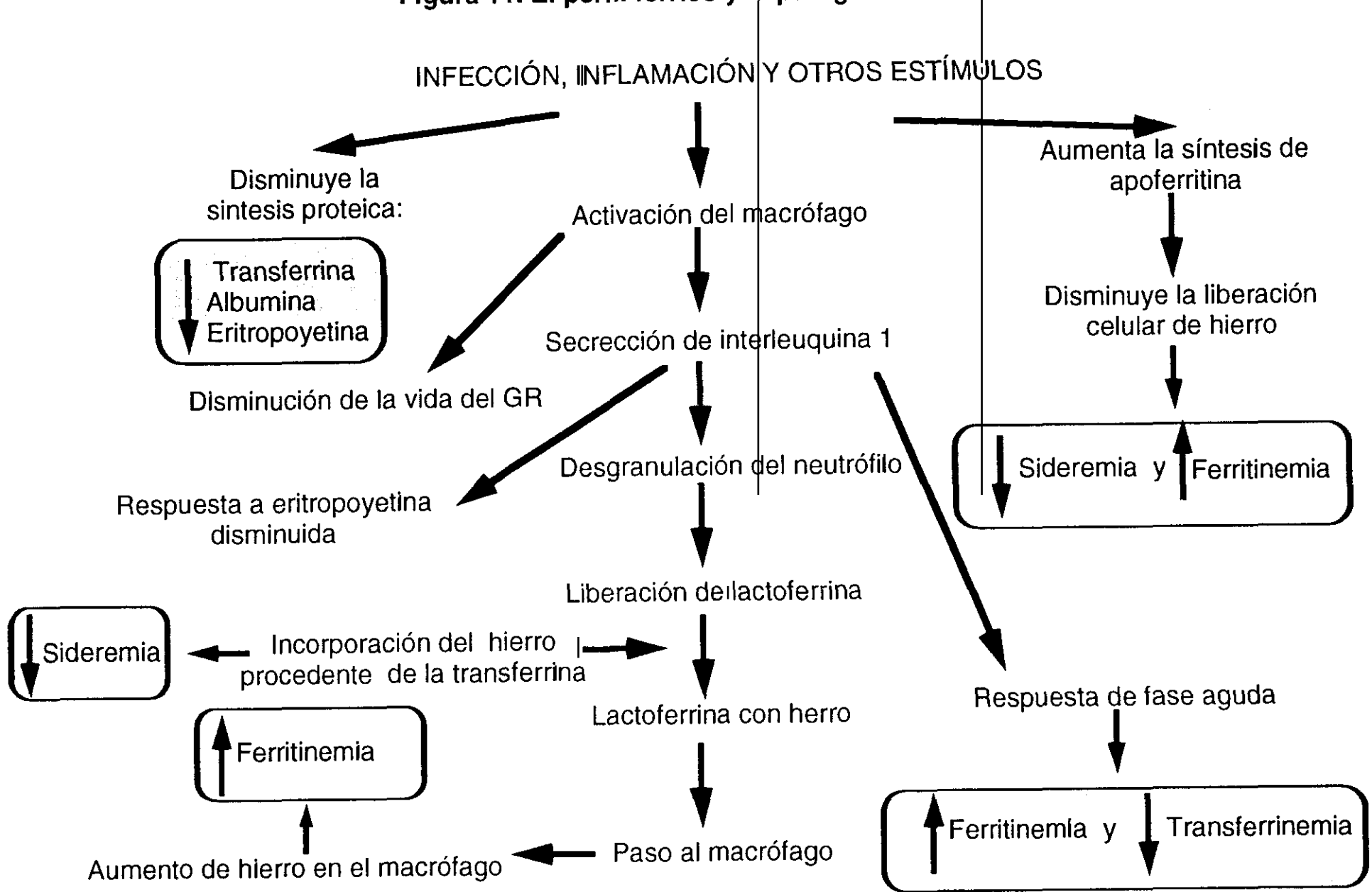
- En ciertos trabajos se corrigió el valor de la concentración de ferritina sérica, asociándola a parámetros de inflamación como la velocidad de sedimentación globular, la proteína C reactiva o el fibrinógeno. En algunos casos se mejoró la sensibilidad en la detección de la ferropenia (196, 197, 198), pero en otros no (199).
- Algunos investigadores han propuesto cambiar el punto de corte de la ferritina en determinados grupos de pacientes, como ancianos (200), y pacientes con insuficiencia renal (201, 202). La medida mejora el valor diagnóstico de la ferritina sérica, pero no resuelve totalmente el problema, porque mientras niveles muy elevados o muy bajos confirman o descartan una deficiencia de hierro, concentraciones dentro del rango normal para personas sanas, no dan información.

El problema no ha sido resuelto y sigue siendo difícil distinguir la anemia ferropénica de la ATC con los parámetros analíticos actuales (figura 11).

2.3.2. DETECCIÓN PRECOZ DE LA HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA:

Actualmente no existen marcadores que permitan identificar la hemocromatosis hereditaria, antes del desarrollo de la sobrecarga. El aumento de la ferritina sólo acontece cuando hay daño hepático, y la elevación de la sideremia y del índice de saturación de la transferrina, levantan sospechas de la dotación genética del individuo, pero no son concluyentes (192).

Figura 11. El perfil férrico y la patogénesis de la ATC



2.4. El receptor soluble de la transferrina.

a) Detección del receptor de la transferrina en suero y en el sobrenadante de cultivos celulares.

En estudios con cultivos de células de eritroleucemia de las líneas K 562 y HL 60 se detectó receptor soluble en el sobrenadante y se empezó a estudiar (203, 204, 205). Posteriormente se demostró la presencia de receptores de transferrina en el suero humano (206). En trabajos posteriores que determinaban sus niveles, la utilización de anticuerpos monoclonales y policlonales de diferente afinidad y dirigidos contra diferentes porciones de la molécula dió lugar a la obtención de diferentes rangos de concentración en suero de personas sanas. La gran disparidad de valores entre los distintos ensayos fué tan grande, que hizo sospechar que la estructura química concreta del compuesto detectado en suero, no debía ser idéntica a la del receptor intacto, que era el utilizado como patrón, y al que iban dirigidos específicamente los anticuerpos del ensayo. Esto también pudiera haber producido una pérdida de sensibilidad en los primeros ensayos.

b) Estructuras del receptor de la transferrina detectado en el suero y en el sobrenadante de cultivos celulares:

Inicialmente se pensó que el receptor soluble de la transferrina detectado en suero (sTfR), podía estar unido a restos de la membrana celular (207, 208, 209, 210), y tener una conformación exosomal vesicular. Estudios posteriores determinaron que:

- En la estructura del sTfR forma parte la molécula de transferrina (211, 212).
- Su peso molecular aparente después de la disociación de la transferrina es de 85 KD, tanto en presencia como en ausencia de sustancias reductoras (213), lo que excluye la presencia de puentes disulfuro en su conformación (211, 212).
- Presenta igual secuencia de aminoácidos del 1 al 19, que la del receptor intacto de la transferrina de la placenta del 101 al 119 (213).

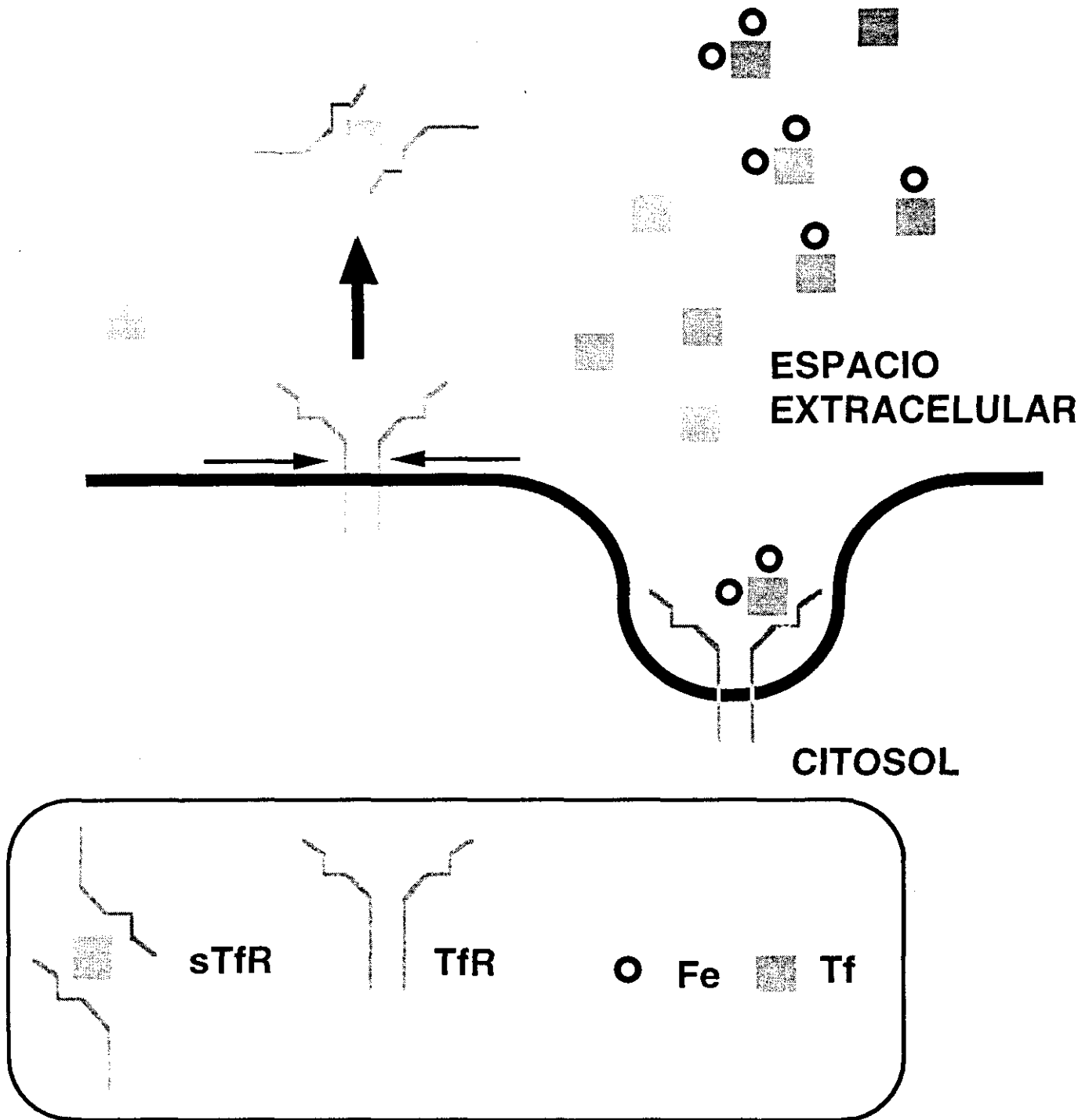
En realidad el sTfR es mayoritariamente una forma truncada del receptor celular, y en mucha menor proporción una forma vesicular (214).

El receptor detectado en el sobrenadante de cultivos celulares era también mayoritariamente una forma truncada del receptor celular (215). Pero en este caso la proporción de receptor vesicular o exosomal es mayor que en el caso del receptor del suero. El sobrenadante de las células eritroleucémicas de la línea celular K 562 tiene un 20% del receptor en forma exosomal y un 80% en la forma truncada. En el caso de la línea celular HL 60 la forma exosomal representa el 5% del receptor del sobrenadante mientras que la truncada aporta el 95% (216, 217). La proporción distinta en suero y en el sobrenadante de cultivos celulares puede ser debida a que el origen del receptor soluble no es el mismo *in vitro* que *in vivo*. Sin embargo también puede explicarse por una diferencia de velocidad de aclaramiento plasmático de cada una de las dos formas.

El receptor truncado detectado en suero y en el sobrenadante de cultivos celulares está constituido por la porción extracelular de las cadenas del receptor celular (213). La hidrólisis de este último a nivel del aminoácido 100 del segmento N-terminal libera dos fragmentos de 85 KD y 571 aminoácidos que provienen de las dos cadenas de 95 KD y 671 aminoácidos. Al ser la concentración de transferrina en suero mucho mayor que la de cadenas de receptor truncado, este se encuentra formando complejos con la transferrina (212). La forma mayoritaria está constituida por dos cadenas de receptor truncado de 85 KD cada una, y una molécula de transferrina de 80KD. El complejo final presenta un peso total de 250 KD (figura 12).

Tras el conocimiento de esta estructura, en las técnicas de determinación de la concentración de sTfR, se pasó a utilizar a este complejo como patrón, y los anticuerpos utilizados en los ensayos, estaban dirigidos específicamente contra él. Con ello se aumentó la sensibilidad y también los valores de referencia en los estudios (212, 218).

Figura 12. Estructura del sTfR



c) Origen del receptor soluble de la transferrina.

Los mecanismos que pueden ocasionar la aparición de un receptor de las membranas celulares en el suero son, o una terminación de la lectura precoz del RNAm del mismo, o una proteólisis (219). En el caso del receptor de la transferrina, la proteólisis es la que ocasiona su aparición en suero. Ya hemos explicado como es el ciclo celular normal y mayoritario del complejo transferrina-receptor (67). Permite la entrada de hierro en la célula, y el reciclaje tanto de la transferrina como del receptor. Es un ciclo inusual, porque en la mayoría de los otros complejos ligando-receptor que se internalizan en la célula, el complejo es finalmente digerido por enzimas celulares, sin posibilidad de reciclaje del ligando y del receptor (66).

La ruta celular descrita es la mayoritaria pero no la única que sigue el receptor. En cultivos de células de la serie roja se ha estudiado otra ruta minoritaria en la que el complejo transferrina-receptor se internaliza en endosomas que contienen múltiples vesículas o exosomas (28, 209, 220, 221, 222, 223, 224). Posteriormente se produce un ataque proteolítico al endosoma multivesicular (225), por parte de una serin proteasa de la membrana celular (226) que produce la escisión del enlace péptido entre los aminoácidos 100 y 101. El aminoácido 104 de las cadenas del receptor es una treonina que está unida a una cadena de hidratos de carbono (227, 228). Su presencia protege de la proteólisis y puede actuar como factor modulador de la degradación del receptor de la transferrina, o de su reciclaje. Finalmente el contenido del endosoma multivesicular es expelido por exocitosis al exterior de la célula (209, 210). In vivo probablemente este sea también el proceso por el que se pierden receptores de transferrina en la célula, y aparecen productos de degradación de los mismos en suero.

En los estudios con cultivos celulares se ha observado también que, la pérdida de receptores de transferrina no es constante, en los distintos estadios del proceso de maduración de la serie roja. La liberación de receptores hacia el sobrenadante está elevada en las fases intermedia y final de la maduración, y alcanza el máximo en el estadio de eritroblasto policromatófilo. Se da una pérdida progresiva de receptores hasta el estadio de reticulocito. El hematíe maduro no tiene receptores (46).

Algunos autores sostienen que esta es una ruta minoritaria, pero exclusiva, de aquellas células que pierden receptores en su membrana. Otros sugieren que esta ruta podría producirse en todas las células del organismo, en un proceso de constante renovación de los receptores.

d) Factores que determinan la concentración del receptor de la transferrina en el sobrenadante de cultivos celulares:

La concentración de receptor en el sobrenadante de cultivos celulares se eleva cuando aumenta:

- El número de células del cultivo,
- El tiempo, cuando las células se encuentran en fase estacionaria.
- El número de receptores presentes en la membrana de cada célula. Este depende del tipo de célula, y de la cantidad de hierro de la misma.

2.5. Conocimientos actuales sobre el significado de la concentración de sTfR:

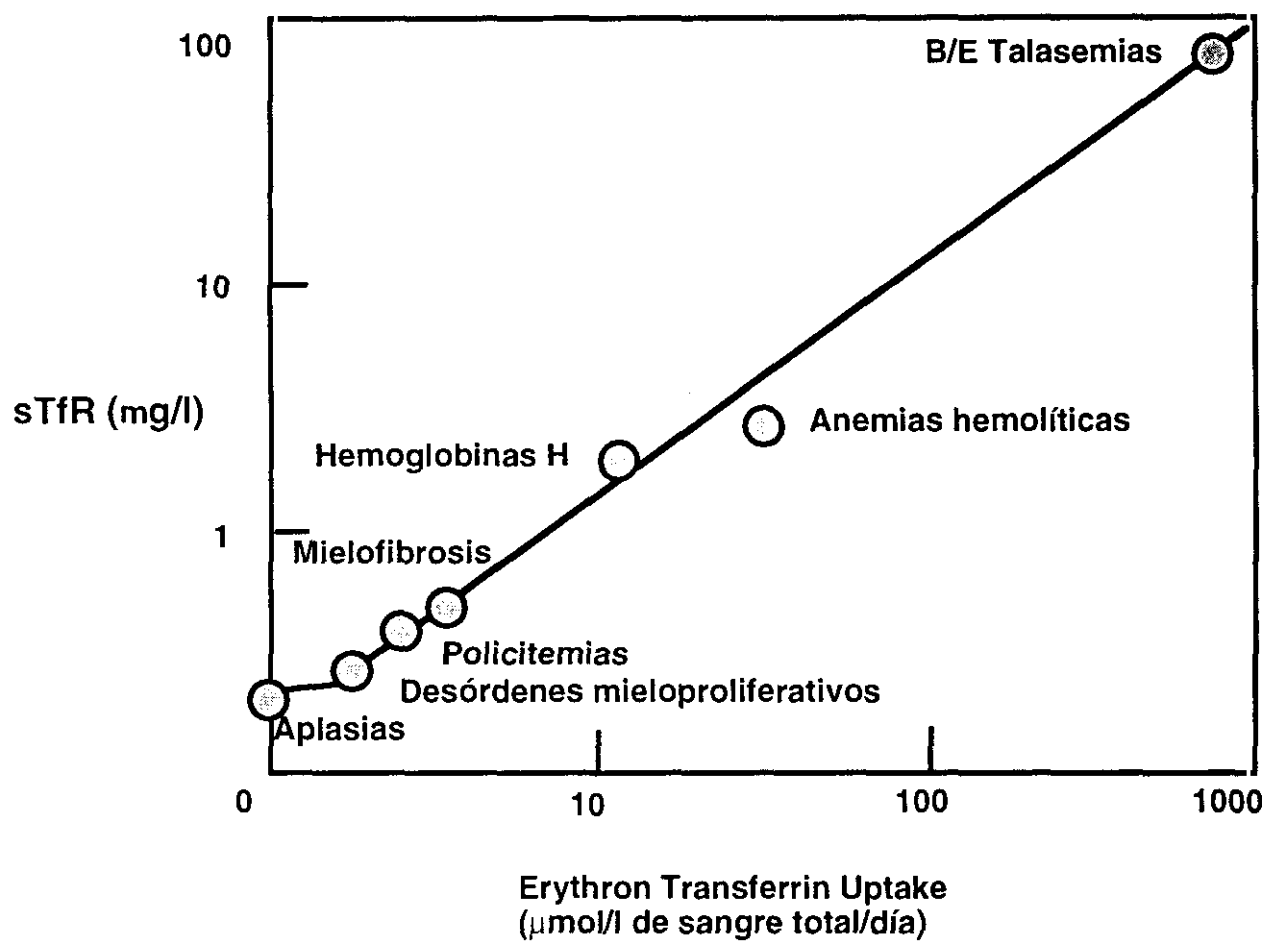
La técnica de determinación de la concentración del sTfR es sencilla, y presenta unas buenas características de linealidad, precisión, límite de detección y recuperación, una baja variabilidad analítica (229), y biológica (230), y puede realizarse en el laboratorio clínico con los medios habituales. Se ha informado disparidad entre los resultados obtenidos con los diferentes ensayos existentes (231, 232). En individuos sanos, el nivel de sTfR, es más alto en niños que en adultos (233). En los últimos no depende de la edad, ni del sexo (234).

En pacientes con aplasia medular, y en aquellos con tratamiento inmunosupresor tras el trasplante, las concentraciones de sTfR están disminuidas en un 70 %, con respecto a las que se detectan en individuos normales (212, 218). Ello sugiere que, aunque todas las células del organismo tienen receptor de transferrina en su membrana, el porcentaje mayor de sTfR circulante, procede de los eritroblastos de la médula ósea. Y probablemente los factores que determinen los niveles de sTfR, estén relacionados con la situación de estas células.

2.5.1. LA ERITROPOYESIS:

Los niveles de sTfR se elevan en determinadas patologías, caracterizadas por un aumento de la proliferación eritroide de la médula, como la anemia hemolítica autoinmune (212), y la anemia falciforme (218). Se ha detectado una correlación estrecha entre el sTfR y la eritropoyesis medida por ferrocínica, en diferentes enfermedades asociadas a eritropoyesis elevadas normales, y disminuidas (212). Se ilustra esta relación en la figura 13.

Figura 13. El sTfR y la eritropoyesis



Los niveles de sTfR guardan una estrecha correlación con la actividad eritropoyética, medida por ferrocínética, y expresada en el parámetro Erythron Transferrin Uptake, en diversas patologías caracterizadas por eritropoyesis hiperplasiada, normal, o disminuida.

La relación entre el sTfR y la actividad eritropoyética que se deducía de estos trabajos, promovió el desarrollo de estudios en los que se utilizó el sTfR como marcador de la actividad eritropoyética, y en algunos de ellos han buscado una aplicación clínica de su determinación.

Se ha propuesto la utilización de un perfil de determinaciones para la clasificación funcional de la anemia, y que esta compuesto por las determinaciones en sangre del hematocrito, la eritropoyetina, el sTfR y el conteo de reticulocitos (235). La determinación de sTfR informaría de si la actividad eritropoyética medular guarda relación directa con el grado de anemia, o si no hay una respuesta eritropoyética medular adecuada. Si el *conteo de reticulocitos está en relación con los niveles de sTfR*, la eritropoyesis es probablemente eficaz. Pero si es menor del esperable, la eritropoyesis es ineficaz, y se generan células inviables que no llegan a salir al torrente sanguíneo. Finalmente la determinación de los niveles de eritropoyetina permitirían establecer, si la liberación renal de la hormona es adecuada para el grado de anemia del paciente.

Durante el tratamiento con eritropoyetina, los incrementos de la concentración de sTfR podrían reflejar una respuesta medular adecuada, tanto en pacientes con insuficiencia renal crónica (236, 237), como en procesos tumorales (238). El incremento de los niveles de sTfR, en respuesta a la proliferación eritroide, parecía originarse antes que la elevación del número de reticulocitos. Algunos autores consideraron conveniente realizar esta monitorización del tratamiento, asociando las determinaciones de sTfR y del conteo de reticulocitos (239). Esto permitiría, no sólo detectar el aumento de la actividad eritropoyética medular, sino también saber si se liberan a sangre células eritroides viables, o por el contrario hay cierto grado de *eritropoyesis ineficaz*. En *pacientes con insuficiencia renal crónica*, se ha asociado el hallazgo de niveles de sTfR elevados, antes de iniciar el tratamiento con eritropoyetina, con una posterior mala respuesta al tratamiento, y con la necesidad de administrar dosis mayores de eritropoyetina (236). Pero este extremo no ha podido ser corroborado (240).

En estos trabajos se consideraba que el sTfR refleja la actividad eritropoyética, mientras que los reticulocitos permitían detectar si la eritropoyesis era eficaz o no. Sin embargo en pacientes con anemia megaloblástica, y con niveles elevados de sTfR, la instauración del

tratamiento adecuado para conseguir una mejora cualitativa del proceso eritropoyético, iba acompañada de un incremento adicional del sTfR (241).

2.5.2. LAS CITOQUINAS Y LA INFLAMACIÓN

In vitro la expresión del receptor de la transferrina celular parece estar estimulada por la interleuquina 2, por la activación mitogénica en las células nucleadas de la sangre, y por el aumento de la concentración de ferritina intracelular que generan algunas citoquinas (242, 243, 244, 245).

En el suero humano, no se ha probado la influencia de estas citoquinas sobre el sTfR. En estudios intraindividuales se observó cierta relación de los niveles de los receptores séricos de interleuquina 2 y interleuquina 6, con los niveles de sTfR (246). Pero esta relación no parecía mantenerse estudiando los parámetros en distintos individuos. Se ha detectado cierta correlación entre la interleuquina 1 B y los niveles de sTfR (247). La perfusión combinada del factor de necrosis tumoral alfa, del interferon gamma, y de la interleuquina 6, produce en pacientes con cáncer, una caída de los niveles de sTfR, probablemente debida a un empeoramiento en la proliferación eritroide medular, o bien a una disminución de la expresión del receptor celular, mediada por estas citoquinas (248).

En contraposición a los estudios anteriores, se ha documentado que los procesos de tipo infeccioso, inflamatorio crónico, y hepatopatías, en los que se incrementan las concentraciones de estas "señales" celulares, no se caracterizan por un incremento de las concentraciones de sTfR (249). Tampoco la malnutrición parece condicionar el comportamiento de este marcador (250).

2.5.3. EL METABOLISMO DEL HIERRO

En los pacientes con anemia ferropénica las concentraciones de sTfR se elevan (218, 249). En voluntarios sanos, en los que se practicó una deplección progresiva de su hierro orgánico, mediante un programa de sangrias periódicas, los niveles de sTfR aumentaron a partir del agotamiento de los depósitos de hierro, de forma proporcional al desarrollo de la deficiencia (251). El incremento de los niveles de sTfR era mas precoz que el de otros parámetros de deficiencia (figura 14). Se ha propuesto que la determinación de sTfR podría ser útil en la detección de la deficiencia

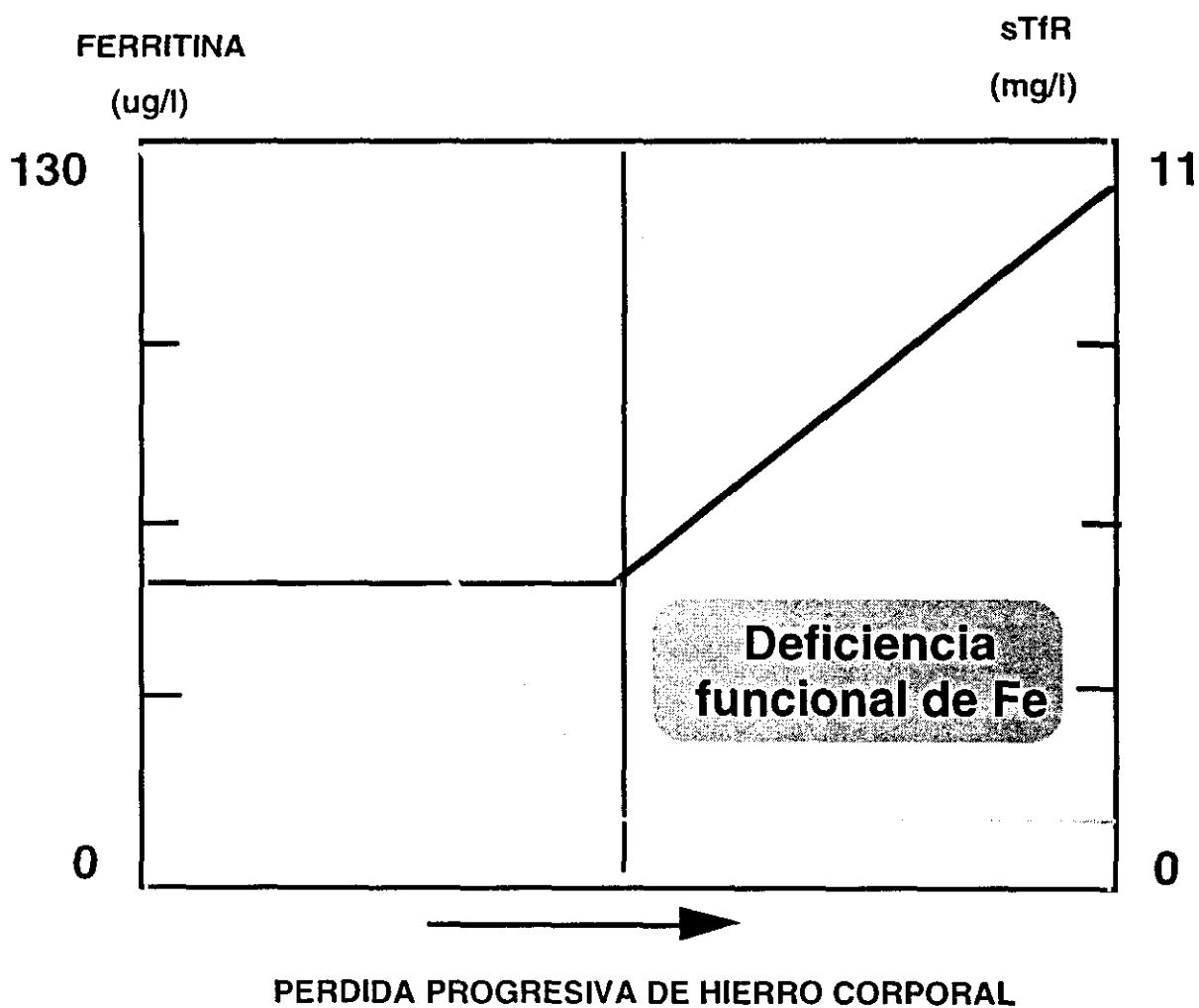
subclínica de hierro (252). El tratamiento de pacientes con ferropenia produce un aumento inicial de la concentración del sTfR, probablemente ocasionado por la crisis reticulocitaria (253), seguido de una disminución progresiva de los niveles de sTfR, paralela a la remisión de la deficiencia (254).

El sTfR no parece útil para estudiar el metabolismo del hierro en el neonato (255), ni en la adolescencia (256). Algunos autores defienden que en el embarazo, la determinación del sTfR permite detectar la ferropenia mejor que la ferritina sérica (257, 258). Pero también este extremo ha sido puesto en tela de juicio (254).

En algunos trabajos la conducta del sTfR, no parecía alterarse en enfermos con procesos infecciosos, inflamatorios, nutricionales, y hepatopatis, situaciones que si dificultan la interpretación de los parámetros utilizados habitualmente para explorar el status férrico (218). La estabilidad del parámetro frente a estas situaciones, unida a su comportamiento en la anemia ferropénica, motivó que se desarrollaran estudios, encaminados a evaluar la utilidad de este marcador para detectar la anemia ferropénica, en pacientes en los que la interpretación los parámetros bioquímicos clásicos es compleja, por la patología subyacente del enfermo. En este punto los resultados son muy controvertidos, y frente a autores que defienden la utilidad de la determinación del sTfR, para diferenciar la anemia ferropénica y la anemia de los trastornos crónicos, otros obtienen resultados diametralmente opuestos.

En suma el comportamiento del sTfR en el metabolismo del hierro y sus alteraciones es confuso, y sus aplicaciones clínicas, todavía inciertas.

Figura 14. Evolución del sTfR en el desarrollo de la deficiencia



3. OBJETIVOS

A) Objetivos primarios

Nuestro objetivo fundamental es evaluar la relación existente entre concentración sérica del sTfR, y el metabolismo férrico, en condiciones patológicas. Pretendemos estudiar los siguientes aspectos:

- 1) La concentración sérica de sTfR en la deficiencia de hierro del compartimento de depósito, y del compartimento funcional.
- 2) Los cambios secuenciales en la concentración sérica de sTfR en los distintos estadios de la ferropenia.
- 3) Las variaciones en la concentración del sTfR en aquellos pacientes que tienen una suficiente cantidad de hierro en depósito, pero en los que el metal está bloqueado en los macrófagos y no accede al eritroblasto.

b) Objetivos secundarios:

Analizar la influencia ejercida sobre la concentración de sTfR, por otros factores, diferentes al propio metabolismo del hierro, como son:

- 1) El grado de eritropoyesis.
- 2) Las alteraciones madurativas de las células eritropoyéticas.
- 3) La presencia de una respuesta inflamatoria sistémica.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Pacientes:

Hemos analizado 172 pacientes que fueron remitidos a la consulta de Hematología analítica de nuestro hospital en los años 1996 y 1997 para la realización de un estudio de médula ósea por diferentes motivos clínicos. En el grupo estudiado había 91 hombres y 81 mujeres con una edad media de 62 y un rango de 18 a 87 años. Había 95 pacientes con anemia y 77 sin anemia. Los diagnósticos de los enfermos se repartían de la siguiente forma:

- 92 pacientes con enfermedades hematológicas malignas (67 linfomas, 15 mielomas, 6 síndromes mieloproliferativos, 2 anemias refractarias y dos leucemias).
- 24 tumores sólidos.
- 19 infectados por el VIH con fiebre.
- 13 pacientes con síndrome febril prolongado.
- 7 pacientes con síndrome constitucional.
- 17 pacientes sin diagnóstico definido.

Todos los enfermos dieron su consentimiento informado antes de someterse al estudio.

4.2. Métodos:

De acuerdo con los protocolos de nuestra institución, un estudio de médula ósea supone la obtención y estudio de muestras de aspirado y biopsia medular, y de sangre periférica. No fue necesario realizar ninguna extracción adicional con respecto a las que se precisan para la exploración clínica.

4.2.1. ESTUDIO MICROSCÓPICO DEL ASPIRADO Y BIOPSIA MEDULAR

El estudio medular incluye:

-El análisis histológico y citológico de la celularidad medular global, y de las tres series hematopoyéticas, tanto a nivel cuantitativo como cualitativo, a partir de las preparaciones teñidas con May-Grumwald Giemsa (260). *Recogimos de dicho informe los datos del estudio cuantitativo y cualitativo de la eritropoyesis.*

-La observación microscópica de las muestras teñidas con la técnica de Perls, que permite establecer el estado y disposición del hierro en médula ósea (170, 171). El ácido clorhídrico de la tinción, libera a los iones férricos, de su unión a las proteínas. Estos iones reaccionan con ferrocianuro potásico, originando un precipitado azul verdoso de ferrocianuro férrico, visible al microscopio (261).

La cuantía de los depósitos de hierro se valoró utilizando el índice de Rath, que puntúa los mismos según una escala semicuantitativa desde 0 a 6. También se contabilizó el porcentaje de sideroblastos (eritroblastos con gránulos de hemosiderina visible) que había sobre el total de eritroblastos observados (170, 171, 255).

4.2.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE:

Se procesó una muestra de sangre total en un contador H 1 Technicon (Bayer diagnostic, Tarrytown, Estados Unidos). El hemograma que emite este analizador detalla la concentración de hemoglobina, el volumen corpuscular medio, la concentración de hemoglobina corpuscular media, la alarma de hipocromia, y finalmente el RDW y HDW como parámetros de dispersión de volúmenes y concentraciones de hemoglobina corpusculares.

La hemoglobina se determina en este aparato, por el método de la cianometahemoglobina. Este método consiste en diluir la sangre en una solución de ferricianuro potásico, y cianuro potásico. El ferricianuro oxida la hemoglobina a hemiglobina. Esta última se asocia al cianuro, formando hemiglobincianuro. Finalmente se mide la absorbancia de este complejo a 540 nm (262).

El resto de los parámetros hemáticos se mide por citometría de flujo y difracción óptica, utilizando una fuente de luz láser monocromática, y midiendo la luz difractada en un microscopio de campo oscuro a ángulo bajo y a ángulo alto (263).

En 82 pacientes también se utilizó sangre total para determinar el número de reticulocitos por volumen de sangre en un contador H 3 Technicon. La muestra se trataba primero con naranja de tiazol, molécula que se une específicamente al RNA citoplasmáticos de los reticulocitos. Los reticulocitos son identificados y contados por citometría de flujo, en concordancia con la absorción de luz debida al naranja de tiazol (264).

Las determinaciones de hierro, transferrina, ferritina y el índice de saturación de la transferrina se realizaron con reactivos de Boehringer Mannheim, en un autoanalizador Hitachi 911 (Tokyo, Japon), a partir de la muestra de suero.

La sideremia se midió por el método de la ferrozina, en el que no es necesaria la desproteización. El método consiste inicialmente en liberar el hierro unido a transferrina, estableciendo un pH ácido, y reducir los iones férricos a ferrosos por la acción del ascorbato. Finalmente se hace reaccionar a los iones ferrosos con ferrozina, lo que origina un complejo coloreado, cuya absorbancia se mide a 570 nm, tomando una medida de referencia a 700 nm (265).

El índice de saturación de transferrina se determinó añadiendo exceso de hierro a la muestra, para saturar los lugares de unión a la transferrina. El exceso de hierro se retira por adsorción. Luego se determina la concentración de hierro como se ha descrito arriba. Finalmente se calcula el índice de saturación de la transferrina, en base al porcentaje de esta concentración que representa la sideremia (266).

La concentración de transferrina se determinó por inmunoturbidimetría. La técnica consiste en enfrentar al suero del paciente, con una solución tamponada de anticuerpos antitransferrina. La unión de la transferrina a los anticuerpos genera la formación de un complejo transferrina-anticuerpos, que se mide por inmunoturbidimetría a una longitud de onda de 600 nm. Se utiliza como referencia, la medición a una longitud de onda de 700 nm (267).

La determinación de la concentración de ferritina, se realizó también mediante un test inmunoturbidimétrico. En este ensayo se añade a la muestra de suero, un reactivo que contiene anticuerpos antiferritina, unidos a partículas de latex. Los anticuerpos antiferritina se unen a esta, formando un

complejo antígeno-anticuerpo, que después de aglutinación, se mide por turbidimetría a 700 nm (267).

La concentración de sTfR se determinó con un enzimoimmunoensayo de tipo *doble sandwich* IDeA™(Orlon diagnostica, Espoo, Finlandia). La muestra se añade a los pocillos, en los que se encuentra el anticuerpo anti-receptor de transferrina, ligado a la fase sólida. Luego se añade una solución tamponada, en la que se encuentra un segundo anticuerpo anti-receptor, que en este caso esta ligado a una enzima. La adición de un sustrato específico para esa enzima genera un producto coloreado, cuya absorbancia se mide a 405 nm.

La velocidad de sedimentación globular se determinó por el método de Westergren modificado. Este método consiste en determinar, en una pipeta de Westergren, la velocidad de sedimentación de los glóbulos rojos en una hora (268). La cuantificación de la proteína C reactiva se realizó, aprovechando una alícuota de la muestra de suero, y mediante nefelometría (269). Utilizamos un analizador Behring Nefelometro II, y reactivos de esta misma marca.

4.2.3. EVALUACIÓN DEL METABOLISMO DEL HIERRO:

4.2.3.1. Analítica de los compartimentos orgánicos del hierro:

El metabolismo del hierro se evaluó por compartimentos.

a) Compartimento funcional:

-A nivel central la observación microscópica de los gránulos de hemosiderina en las preparaciones de aspirado y biopsia teñidas con la técnica de Perls permite establecer el estado de disposición del hierro en médula ósea con el índice de Rath y el porcentaje de sideroblastos (270, 271). El sTfR también se puede considerar un parámetro de este compartimento pues esa es su procedencia.

-A nivel periférico el hemograma proporciona los datos de la concentración de hemoglobina, el volumen corpuscular medio, la concentración de hemoglobina corpuscular media, RDW, HDW y alarmas de microcitosis e hipocromia. Estos parámetros se alteran progresivamente en el desarrollo de una eritropoyesis deficiente en hierro.

b) Compartimento de transporte:

Las concentraciones de hierro y transferrina séricas, y el índice de saturación de transferrina informan del status férrico en este compartimento.

c) Compartimento de depósito:

Su exploración se basó en el examen microscópico de los depósitos férricos medulares plasmado en el índice de Rath. La concentración de ferritina sérica también es un marcador de este compartimento.

5.2.3.2. Clasificación de los pacientes en función de su status férrico:

Se utilizaron dos criterios

-Patrón de disposición del hierro en la médula ósea.

Se establecieron cuatro grupos de pacientes en función del índice de Rath y del porcentaje de sideroblastos en médula ósea, de acuerdo con criterios ampliamente admitidos (271):

Patrón de disposición normal de hierro compuesto por los pacientes con un índice de Rath igual o mayor de 2 y un porcentaje de sideroblastos superior al 20 %.

Patrón de ferropenia compuesto por los pacientes que presentaban un índice de Rath de 1 ó 0.

Patrón de bloqueo del hierro en el que se incluye los pacientes con índice de Rath mayor o igual a 2 y porcentaje de sideroblastos inferior al 20 %.

Patrón de sobrecarga de hierro compuesto por aquellos pacientes con IR igual o mayor de 5 y porcentaje de sideroblastos superior al 60%.

Esta era una clasificación básica, pero, a lo largo del estudio, se estudiaron otros aspectos del metabolismo del hierro:

En algunas ocasiones se analizaron los pacientes ferropénicos (con un índice de Rath igual a 1 ó 0), frente a los no ferropénicos (con un índice de Rath superior).

A veces se estudiaban los pacientes que tenían un buen manejo del hierro existente en médula (independientemente de que la cantidad del mismo fuera suficiente o insuficiente), y los que tenían una buena utilización del metal. El primer grupo estaba formado por los que tenían una disposición de hierro normal y los ferropénicos. Los pacientes con una utilización inadecuada del hierro eran los que tenían el hierro bloqueado.

Cuando se evaluaban las fases de la ferropenia se establecían tres grupos de pacientes. El grupo de pacientes sin ferropenia, y que servía de referencia, coincidía con el patrón de disposición normal. A partir del grupo de pacientes ferropénicos se establecían dos grupos: ferropenia latente y ferropenia funcional. En el primer caso se incluían aquellos pacientes con porcentaje de sideroblastos superior al 20 %, y en el segundo caso los pacientes con porcentaje de sideroblastos igual o inferior al 20%.

-Deficiencia funcional de hierro:

La existencia o no de este estado se definió cuando existían los criterios siguientes:

- El índice de saturación de la transferrina.
- El porcentaje de sideroblastos en médula ósea.
- La alarma de hipocromía en los hematíes de sangre periférica.

El índice de saturación de la transferrina (IST) refleja el suministro de hierro desde el compartimento de transporte hacia el compartimento funcional (117). Este parámetro tiene una menor variabilidad analítica (272) que la sideremia. El porcentaje de sideroblastos en médula ósea es función de la cantidad de hierro que tienen los eritroblastos para la síntesis de hemoglobina (270). La detección de eritrocitos hipocrómicos en el hemograma acontece después del desarrollo de una eritropoyesis deficiente en hierro durante un cierto periodo de tiempo (273). Sobre esta

base, el índice de saturación de la transferrina < 20 %, el porcentaje de sideroblastos < 20 % o la alarma de hipocromia en el hemograma se consideraron criterios indicadores de deficiencia funcional de hierro.

También se estableció una clasificación del grado de deficiencia funcional en base al número de parámetros alterado entre los tres mencionados. Se consideraban pacientes sin deficiencia funcional aquellos con los tres parámetros normales. La deficiencia funcional se definía *moderada cuando sólo estaban afectados uno o dos, y severa en aquellos pacientes que tenían los tres parámetros alterados.*

4.2.4. EVALUACIÓN DE LA ERITROPOYESIS

a) El grado de actividad eritropoyética:

El examen del aspirado y biopsia de médula ósea sirvió para establecer tres grados de eritropoyesis (260): Aumentada, normal o disminuida. Asimismo en 82 pacientes se determinó de forma adicional el número de reticulocitos por volumen de sangre.

b) El proceso de maduración y la diseritropoyesis

A partir del estudio citológico e histológico de la médula se analizó si el proceso de maduración y proliferación de la estirpe eritroide era adecuado o existían alteraciones patológicas del mismo.

4.2.5. RESPUESTA INFLAMATORIA CRÓNICA:

Para detectar la presencia de una respuesta inflamatoria crónica, que pudiera afectar tanto a los parámetros del metabolismo férrico, como a la actividad madurativa medular, realizamos dos parámetros de cribado:

- Determinación de la velocidad de sedimentación globular (VSG).
- Determinación de la concentración de la proteína C reactiva.

Consideramos que existía una respuesta inflamatoria cuando la VSG era igual o superior a 50 mm/hora, y, además, la concentración sérica de proteína

C reactiva era igual o superior a 1,3 mg/dl. Asimismo, establecíamos que no existía tal respuesta cuando ambos parámetros estaban por debajo de estos valores. Los 50 pacientes en los que, un parámetro estaba elevado, y el otro no, no se incluyeron en ninguno de los dos grupos.

4.3 Análisis estadístico:

El estudio de los valores de los parámetros cuantitativos entre los diferentes grupos de pacientes se realizaba con la t de student ó la U de Mann Withney en el caso de que hubiera dos grupos, y con el análisis de varianza y el test de Kruskal Wallis cuando había mas de dos grupos. Cuando con estos últimos se detectaban diferencias significativas, la identificación de las diferencias entre grupos se basaba en el primer caso en la F de Scheffe, y en el segundo caso en el test de Nemenyi. La relación entre dos parámetros cuantitativos se estudiaba mediante el estudio de la regresión lineal. La asociación entre variables cualitativas se evaluaba con la prueba de la Chi cuadrado, o mediante el test exacto de Fisher. La influencia real de las distintas variables sobre los niveles de sTfR fué establecida mediante los resultados estadísticos de los modelos lineales generalizados. Los niveles de significación se establecieron de la manera habitual para todos los test: $p < 0,05$ = significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Estudio preliminar de las variables

5.1.1. INFLUENCIA DEL ESTADO Y DISPOSICIÓN DEL HIERRO EN MÉDULA ÓSEA SOBRE LOS PARÁMETROS DEL PERFIL FÉRRICO Y EL HEMOGRAMA

5.1.1.1. El perfil férrico:

a) Comportamiento del perfil férrico:

Los parámetros que componen el perfil férrico presentaban diferencias significativas en los distintos patrones de disposición de hierro en médula ósea (tabla 1).

Los pacientes con ferropenia presentaron niveles de transferrina sérica significativamente más altos que el resto de los grupos, y también concentraciones de ferritina sérica significativamente más bajas.

En los pacientes con patrón de bloqueo se observó que el hierro sérico y el índice de saturación de la transferrina se encontraban significativamente disminuidos con respecto a los pacientes con patrón de disposición normal y de sobrecarga.

Los pacientes con patrón de sobrecarga tuvieron una sideremia y un índice de saturación de la transferrina significativamente superiores a los otros grupos. La ferritina sérica no llegó a ser significativamente mayor en este grupo.

En los pacientes con patrón de hierro normal las concentraciones de transferrina y ferritina séricas no se ajustaron a los rangos de referencia utilizados en nuestro laboratorio (220 a 400 mg/dl para la transferrina y 20 a 300 ug/l para la ferritina). La transferrina se encontraba disminuida y la ferritina aumentada.

Tabla 1. Los parámetros del perfil férrico en los distintos patrones de disposición del hierro en médula ósea.

Patrón mo	Parámetros del perfil ferrico				
	Fe (µg/dl)	Tf (mg/dl)	Ft (µg/l)	IST (%)	VSG (mm/h)
Normal n = 60	68 (13-232) 75±45	238(134-342) 234±50	302 (44-2465) 482±434	22 (6-90) 25±15	30 (1-140) 51±47
Ferropenia n = 45	61 (21-132) 67±28	275(159-442) 282±68	79 (2-4450) 330±750	16 (7-44) 19±8	45 (9-140) 55±42
Bloqueo n = 49	44 (11-139) 48±30	241(114-325) 233±55	323 (26-4870) 621±894	14 (4-41) 15±8	97 (10-140) 83±39
Sobrecarga n = 18	122 (41-177) 112±42	234(130-317) 228±56	482 (129-2592) 799±753	36 (14-90) 42±23	55 (6-137) 65±52
p (ANOVA)	<0,0001*	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001***	<0,05****

Patrón mo: Patrón de disposición del hierro en médula ósea, Fe: Sideremia , Tf: Transferrina sérica, Ft: Ferritina sérica, IST: Índice de saturación de la transferrina, VSG: Velocidad de sedimentación globular.

Los datos se expresan como mediana (rango), y media ± SD.

*Se detectan diferencias significativas entre patrón normal y bloqueo, normal y sobrecarga, ferropenia y bloqueo, ferropenia y sobrecarga, y bloqueo y sobrecarga.

** Se detectan diferencias significativas entre los pacientes ferropénicos y el resto de los grupos.

*** Se detectan diferencias significativas entre los pacientes con patrón normal y patrón de bloqueo, patrón normal y patrón de sobrecarga, patrón de ferropenia y patrón de sobrecarga, y patrón de bloqueo y patrón de sobrecarga.

****Se detectan diferencias significativas entre patrón normal y bloqueo.

b) La ferritina y la detección de la ferropenia.

Se encontraron niveles superiores al rango normal en numerosos pacientes y de todos y cada uno de los grupos de disposición de hierro, incluidos los ferropénicos.

El punto de corte de la ferritina utilizado en nuestro laboratorio para la detección de la ferropenia es de 20 $\mu\text{g/l}$. Con este criterio sólo se detectaron 9 de los 45 pacientes ferropénicos aunque sin que hubiera falsos positivos. El estudio de la curva ROC para los niveles de ferritina (figura 15), aconsejó la adopción para este tipo de pacientes de un punto de corte de 85 $\mu\text{g/l}$ de manera que se aumentaba la sensibilidad a 25 de los 45 pacientes, es decir un 56 %, a expensas de originar sólo 6 falsos positivos de los 127 pacientes no ferropénicos, con un 95 % de especificidad. Este punto de corte coincide con el de un estudio previo realizado en este mismo tipo de pacientes en nuestro centro, en los que se obtuvo un punto de corte similar y con idénticas características de sensibilidad y especificidad (311).

c) La transferrina sérica y la detección de la ferropenia:

La media y desviación estándar de la concentración de transferrina sérica en nuestros pacientes ferropénicos fué de 282 ± 87 mg/dl, y era significativamente superior a las concentraciones de transferrina del resto de los pacientes del estudio (figura 16). Los valores de concentración de transferrina de los pacientes ferropénicos se encontraban dentro del rango de referencia de nuestro laboratorio y no por encima de este.

Si tomábamos como referencia la concentración de transferrina sérica máxima de los pacientes no ferropénicos (342 mg/dl), y considerábamos ferropénicos aquellos con concentraciones de transferrina superiores, como criterio adicional al del punto de corte de la ferritina, se conseguía aumentar la sensibilidad a 27 de los 45 pacientes ferropénicos, es decir a un 60%, sin merma alguna en la especificidad.

Figura 15. Curva ROC para la concentración de ferritina sérica

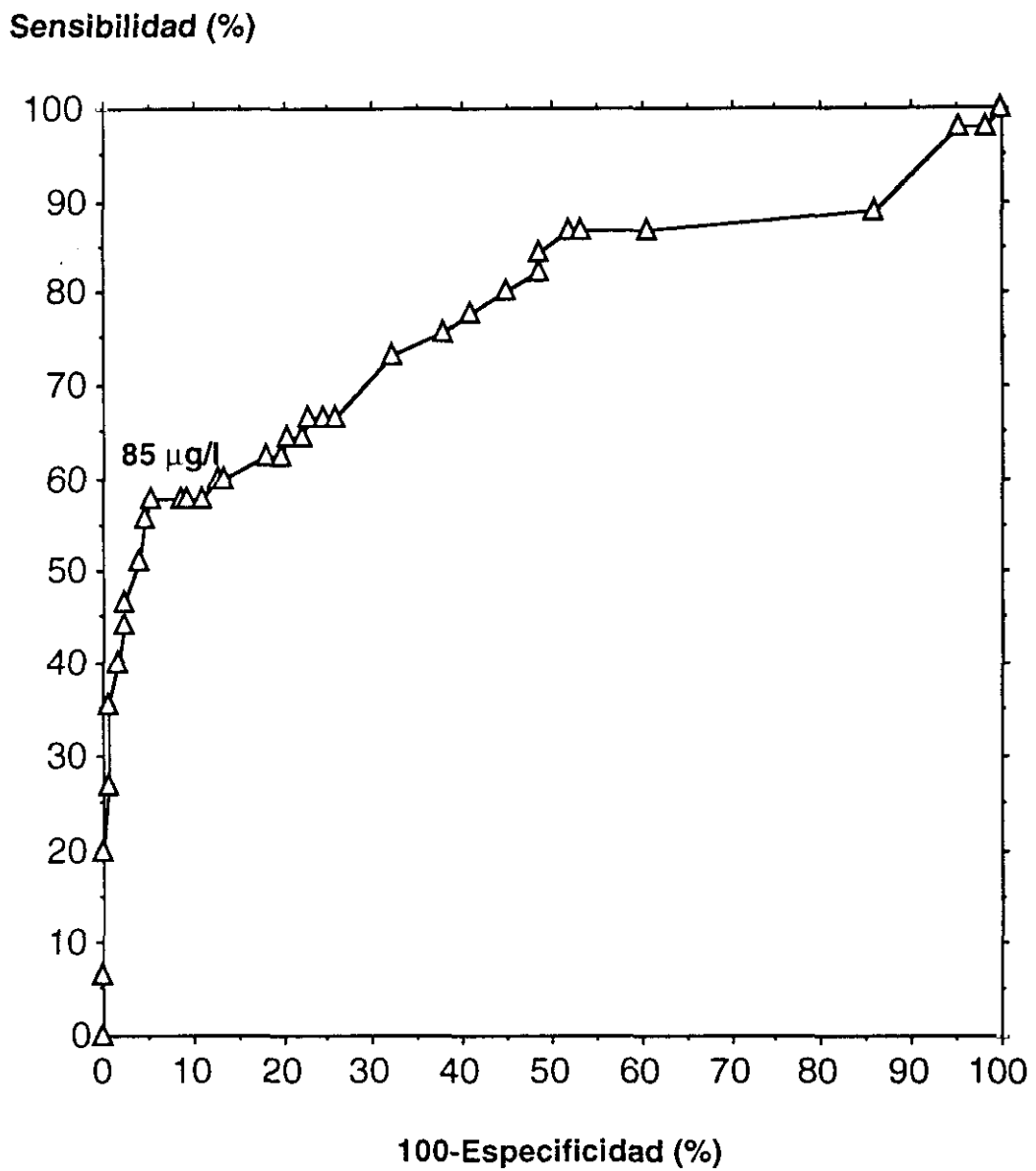
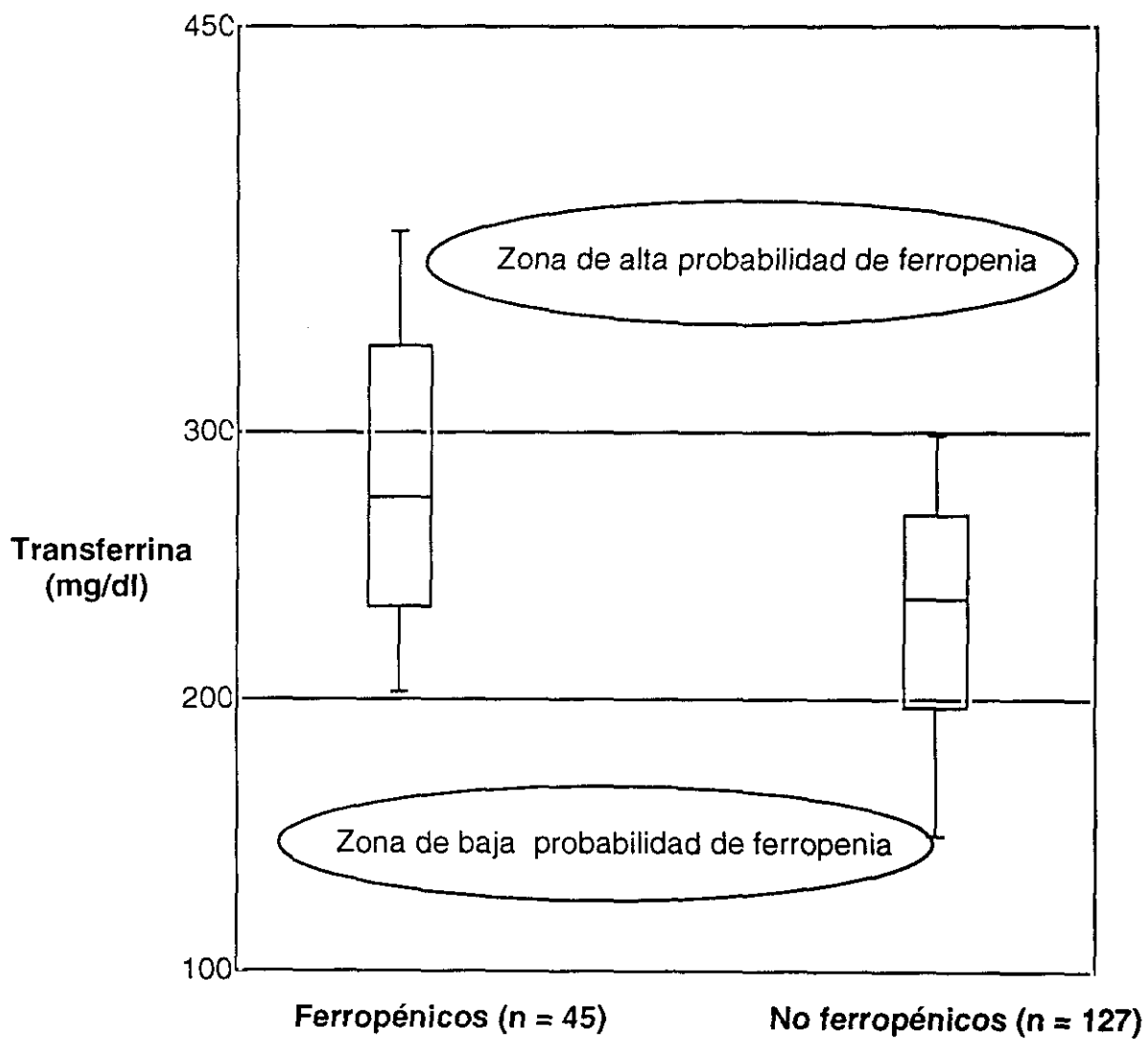


Figura 16. Concentración de transferrina en suero en pacientes con ferropenia o con depósitos de hierro suficientes.



5.1.1.2. El hemograma por patrones de disposición del hierro en médula ósea:

No se encontraron diferencias significativa en las tasas de hemoglobina en los distintos patrones de disposición del hierro en médula ósea. Los parámetros de dispersión corpuscular, RDW y HDW, tampoco se diferenciaron significativamente entre grupos. El VCM era significativamente menor en los pacientes con patrón de bloqueo con respecto a aquellos con patrón normal o con ferropenia. En la ferropenia los valores de este parámetro se situaron entre los de los pacientes con bloqueo, y los de los pacientes con disposición normal y disposición de sobrecarga, pero no fueron significativamente diferentes a estos últimos.

La CHCM estaba casi significativamente afectada por el patrón de disposición del hierro en médula ósea. Los resultados están recogidos en la tabla 2.

Tabla 2. El hemograma en los distintos patrones de disposición del hierro en médula ósea.

Patrón mo	Parámetros del hemograma				
	Hb (g/dl)	VCM (fl)	CHCM (g/dl)	RDW	HDW
Normal n = 60	126±24	91±7	32,9±1,4	15,5±2,8	2,7±0,5
Ferropenia n = 45	123±21	88±9	32,7±1,5	15,9±2,8	3±0,7
Bloqueo n = 49	116±21	86±7	32,5±1,4	15,3±2,2	2,9±0,5
Sobrecarga n = 18	119±25	92±6	33,5±1	15,7±2,7	2,9±0,6
p (ANOVA)	NS	<0,005*	<0,1**	NS	NS

Patrón mo: Patrón de disposición del hierro en médula ósea, Hb: Concentración de hemoglobina, VCM: Volumen corpuscular medio, CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media, RDW y HDW: Índices de volúmenes y concentraciones de hemoglobina de los hematíes, NS: No significativo.

* Se detectan diferencias significativas entre los pacientes con bloqueo y los pacientes con patrón normal, y entre los pacientes con bloqueo y los pacientes con sobrecarga.

** Se detectan diferencias significativas entre los pacientes con bloqueo y los pacientes con ferropenia, y entre los pacientes con bloqueo y los pacientes con sobrecarga.

5.1.2. LOS PARÁMETROS DEL PERFIL FÉRRICO Y DEL HEMOGRAMA EN LOS DISTINTOS ESTADÍOS DE LA FERROPENIA:

5.1.2.1. El perfil férrico:

En los pacientes con ferropenia latente, y con ferropenia funcional, la ferritina fué significativamente menor, y la transferrina significativamente mayor que en los pacientes sin ferropenia. La sideremia y el IST estaban significativamente disminuidos, sólo en la ferropenia funcional (tabla 3).

Tabla 3. Los parámetros del perfil férrico en los distintos estadios de la ferropenia.

Estadio	Parámetros del perfil ferrico				
	Fe (µg/dl)	Tf (mg/dl)	Ft (µg/l)	IST (%)	VSG (mm/h)
Normal n = 60	68 (13-232) 75±44	238(134-342) 234±50	302 (44-2465) 482±435	22 (6-90) 25±15	30 (1-140) 51±47 (n = 30)
Ferropenia latente n = 15	72 (38-132) 84±28	268(219-422) 272±55	79 (19-302) 114±91	22 (12-44) 24±8	44 (9-116) 47±37 (n = 8)
Ferropenia funcional n = 30	54 (21-108) 58±22	284(159-442) 287±73	78 (2-4450) 438±900	16 (7-35) 16±6	49 (10-140) 59±44 (n = 21)
p (Kruskall-Wallis).	<0,05*	<0,001**	<0,0001**	<0,005*	NS

EDH: Eritropoyesis deficiente en hierro.

*Se detectan diferencias significativas entre ferropenia funcional y los otros dos grupos.

** Se detectan diferencias significativas entre pacientes sin ferropenia y los otros dos grupos

5.1.2.2. El hemograma:

No existían diferencias significativas en las tasas de hemoglobina ni en la CHCM entre los distintos estadios de ferropenia. Los pacientes con ferropenia funcional presentaban disminución significativa del VCM, y un aumento significativo del HDW. (tabla 4).

Tabla 4. Los parámetros del hemograma en los distintos estadios de la ferropenia.

Estadio	Parámetros del hemograma				
	Hb (g/dl)	VCM (fl)	CHCM (g/dl)	RDW	HDW
Normal n = 60	126±24	91±7	32,9±1,4	15,5±2,8	2,7±0,5
Ferropenia prelatente n = 15	131±16	92±7	32,9±1,3	14,3±1,7	2,6±0,4
Ferropenia funcional n = 30	119±22	86±7	32,5±1,5	16,4±2,7	3,1±0,8
p (ANOVA)	NS	<0,005*	NS	<0,1**	<0,005***

*Se detectan diferencias significativas entre los pacientes con ferropenia funcional y los de patrón normal.

**No se detectan diferencias significativas entre grupos.

***Se detectan diferencias significativas entre los pacientes con ferropenia funcional y los otros dos grupos.

5.1.3. LA DEFICIENCIA FUNCIONAL DE HIERRO

5.1.3.1. Relación entre los criterios de deficiencia

No se demostró correlación entre el índice de saturación de la transferrina y el porcentaje de sideroblastos. Los tres parámetros utilizados para definir la deficiencia funcional de hierro (índice de saturación de transferrina < 20%, porcentaje de sideroblastos < 20 % y alarma de hipocromia en el hemograma) presentaron una asociación cualitativa altamente significativa tomados dos a dos (tabla 5).

Tabla 5. Asociación entre los parámetros marcadores de la deficiencia funcional.

		Sideroblastos				AHH				AHH	
		<20%	<20%			Si	No			Si	No
IST	<20%	59 (74 %)	33 (35 %)	IST	<20%	45 (86 %)	47 (39 %)	Sid	<20%	35 (67 %)	44 (37 %)
	<20%	20	60		<20%	7	73		<20%	17	76
Chi²		26,38				32,72				13,72	
		p < 0,0001				p < 0,0001				p < 0,0005	

AHH: Alarma de hematíes hipocrómicos .

Estudiamos la sensibilidad y especificidad de cada uno de los parámetros con respecto a los otros (tabla 6). El parámetro mas sensible fué el índice de saturación de la transferrina, mientras que el mas específico fué la alarma de hematíes hipocrómicos. El índice de saturación de la transferrina era el parámetro que presentaba mejor rendimiento conjunto sensibilidad / especificidad.

Tabla 6. Sensibilidad y especificidad de cada uno de los parámetros de deficiencia funcional con respecto a los otros.

	Criterio de referencia					
	Respecto a IST		Respecto a Sid		Respecto AHH	
	AHH	Sid	IST	AHH	IST	Sid
Sensibilidad (%)	49	64	75	44	87	67
Especificidad (%)	87	75	64	67	49	44

Sid: Porcentaje de sideroblastos.

5.1.3.2. El perfil férrico y el hemograma en la deficiencia funcional de hierro:

Las concentraciones de transferrina y ferritina sérica eran muy similares entre los pacientes con y sin deficiencia funcional de hierro, pero la sideremia era significativamente inferior en los primeros (tabla 7).

Los pacientes con deficiencia funcional de hierro se caracterizaron por tener tasas de hemoglobina inferiores, VCM y CHCM menores y parámetros de dispersión RDW y HDW superiores (tabla 8).

Tabla 7. El perfil férrico en la deficiencia funcional de hierro.

Criterio	Parámetros del perfil férrico		
	Fe ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	Tf (mg/dl)	Ft ($\mu\text{g}/\text{l}$)
Saturación Tf			
< 20% (n = 92)	43 (11–84)	241 (144–442)	285 (2–4870)
	41 \pm 17	245 \pm 65	578 \pm 860
> 20% (n = 80)	94 (46–232)	245 (130–422)	253 (15–2592)
	101 \pm 36	246 \pm 56	445 \pm 491
Valor de p	< 0,0001	NS	NS
Sideroblastos			
< 20% (n = 79)	50 (11–139)	255 (114–442)	269 (2–4870)
	52 \pm 27	253 \pm 67	552 \pm 896
> 20% (n = 93)	73 (13–232)	239 (130–422)	277 (19–2592)
	84 \pm 44	239 \pm 54	484 \pm 519
Valor de p	< 0,0001	NS	NS
Alarma hipocromia			
Si (n = 52)	43 (11–185)	249 (114–442)	260 (2–4870)
	52 \pm 40	249 \pm 68	530 \pm 713
No (n = 120)	71 (13–232)	244 (130–424)	283 (10–4450)
	77 \pm 38	244 \pm 57	480 \pm 727
Valor de p	< 0,0001	NS	NS

Tabla 8. Los parámetros del hemograma en la deficiencia funcional de hierro.

Criterio	Parámetros del hemograma				
	Hb (g/dl)	VCM (fl)	CHCM (g/dl)	RDW	HDW
Saturación Tf					
< 20% (n = 92)	11,3±2,1	88±8	32,2±1,3	16±2,6	3±0,6
> 20% (n = 80)	<u>13±2,1</u>	91±6	33,5±1,2	14,9±2,5	2,7±0,4
Valor de p	<0,0001	<0,05	<0,0001	<0,001	<0,001
Sideroblastos					
< 20% (n = 79)	11,7±2,1	86±7	32,5±1,4	15,7±2,4	3±0,6
> 20% (n = 93)	12,5±2,4	92±8	33,1±1,3	15,4±2,7	2,8±0,5
Valor de p	<0,05	<0,0001	<0,05	NS	<0,05
Alarma Hipocromia					
Si (n = 52)	10,9±2,1	86±9	31,8±1,2	16,8±2,2	3,2±0,7
No (n = 120)	12,7±2,1	91±7	33,3±1,2	14,9±2,6	2,7±0,4
Valor de p	<0,0005	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

5.1.3.3. La deficiencia funcional y el patrón del hierro en médula ósea:

En este estudio sólo se evaluó el índice de saturación de la transferrina y la alarma de hipocromia, pero no el porcentaje de sideroblastos porque este parámetro se había tenido en cuenta para establecer los distintos patrones de disposición del hierro en médula ósea.

Se observó una asociación significativa entre la deficiencia funcional de hierro (índice de saturación de la transferrina o alarma de hipocromía) y los patrones de bloqueo y ferropenia (tablas 9 y 10).

Tabla 9. Relación entre el índice de saturación de la transferrina superior o inferior al 20 % y el patrón medular de hierro.

		Patrón medular de disposición de hierro			
		Normal	Ferropenia	Bloqueo	Sobrecarga
IST	< 20 %	25 (42 %)	27 (60 %)	37 (75 %)	3 (16 %)
	> 20 %	35	18	12	15

Chi² = 23,5; p < 0,0001

Tabla 10. Relación entre la alarma de hematíes hipocrómicos (AHH) y el patrón medular de hierro.

		Patrón medular de disposición de hierro			
		Normal	Ferropenia	Bloqueo	Sobrecarga
AHH	Si	11 (18%)	16 (35 %)	21 (43 %)	4 (28 %)
	No	49	29	28	14

Chi² = 8,88; p < 0,05

5.1.3.4. Relación de la deficiencia funcional de hierro con el estadio de la ferropenia:

En este caso solo se tuvieron en cuenta el índice de saturación de la transferrina y la alarma de hipocromía como parámetros de deficiencia funcional.

Con ambos parámetros la deficiencia funcional de hierro estaba asociada significativamente a la ferropenia funcional pero no a la ferropenia prelatente (tablas 11 y 12).

Tabla 11. Relación entre el índice de saturación de la transferrina superior o inferior al 20 % y el estadio de la ferropenia.

		Estadio de la ferropenia		
		Normal	F. latente	F. Funcional
IST	< 20 %	25 (42 %)	5 (33 %)	22 (73 %)
	> 20 %	35	10	8

$\text{Chi}^2 = 9,86; p < 0,01$

F. latente: Ferropenia latente, F. Funcional: Ferropenia funcional.

Tabla 12. Relación entre la alarma de hematíes hipocrómicos (AHH) y el estadio de la ferropenia.

		Estadio de la ferropenia		
		Normal	F. latente	F. Funcional
AHH	Si	11 (18 %)	2 (13 %)	14 (47 %)
	No	49	13	16

$\text{Chi}^2 = 9,80; p < 0,01$

5.1.4 LA ACTIVIDAD CELULAR EN MÉDULA: HEMATOPOYESIS Y ERITROPOYESIS

5.1.4.1. El grado de hematopoyesis:

Los contajes de leucocitos y plaquetas estaban significativamente relacionados con el grado de actividad hematopoyética de la médula ósea (tabla 13).

Tabla 13. Recuento de las distintas poblaciones celulares en sangre periférica en función de la actividad hematopoyética observada en el examen microscópico medular.

Poblaciones en sangre periférica			
Celularidad mo	Hemoglobina (g/dl)	Leucocitos ($10^3 \times \mu\text{l}$)	Plaquetas ($10^3 \times \mu\text{l}$)
Alta (n = 24)	11,7 \pm 2,3	11,1 \pm 10	338 \pm 230
Media (n = 110)	12,3 \pm 2,3	7,6 \pm 4,6	251 \pm 145
Baja (n = 38)	12 \pm 2,2	4,8 \pm 2,2	177 \pm 96
Valor p (ANOVA)	NS	< 0,0001	< 0,0005

Mo: médula ósea.

Las diferencias en el recuento de leucocitos y plaquetas eran significativas entre todos los grupos de celularidad observada al microscopio.

5.1.4.2. El grado de actividad eritropoyética:

a) Relación entre el grado de eritropoyesis y el recuento reticulocitario:

Se detectó un influencia significativa y determinante entre la actividad eritropoyética y el contaje de reticulocitos circulantes. Los pacientes con eritropoyesis elevada tuvieron un contaje de reticulocitos de $8,8 \pm 3,9 \times 10^4 / \mu\text{l}$, los que tenían la eritropoyesis normal $6,8 \pm 3 \times 10^4 / \mu\text{l}$ y los que tenían la eritropoyesis disminuida $5,3 \pm 2,1 \times 10^4 / \mu\text{l}$.

b) Relación entre el grado de eritropoyesis y los parámetros del perfil férrico y del hemograma.

No se detectaron diferencias significativas en los parámetros del perfil férrico en función del grado de actividad eritropoyética (tabla 14). Tampoco se detectaron diferencias significativas en las tasa de hemoglobina, el VCM y el CHCM. Pero los pacientes con hiperplasia eritropoyética mostraron un índice de dispersión de corpuscular HDW significativamente superior al resto de los pacientes (tabla15).

Tabla 14. Los parámetros del perfil férrico en los diferentes grados de eritropoyesis.

Grado de eritropoyesis	Parámetros del perfil férrico			
	Fe (µg/dl)	Tf (mg/dl)	Ft (µg/l)	IST (%)
Alta (n = 38)	55 (13–232)	250(130–424)	342(7–4450)	16 (4–90)
	63 ± 44	250 ± 69	666 ± 873	21 ± 17
Normal (n = 82)	57 (13–177)	245(114–442)	278(2–3800)	18 (6–78)
	67 ± 35	250 ± 61	451 ± 568	21 ± 11
Baja (n = 52)	70 (11–185)	235(130–834)	247(21–834)	21 (6–91)
	78 ± 46	237 ± 54	509 ± 785	26 ± 18
Valor de p	NS	NS	NS	NS

Tabla 15. Los parámetros del hemograma en los diferentes grados de eritropoyesis.

Grado de eritropoyesis	Parámetros del hemograma				
	Hb (g/dl)	VCM (fl)	CHCM (g/dl)	RDW	HDW
Alta (n = 38)	11,7±2,5	89 ± 11	32,8 ± 1,4	16,5 ± 3,1	3,1 ± 0,7
Normal (n = 82)	12,3±2,1	89 ± 7	32,7 ± 1,2	15,3 ± 2,4	2,8 ± 0,5
Baja (n =52)	12,1±2,4	90 ± 6	33 ± 1,5	15,2 ± 2,3	2,7 ± 0,5
Valor de p	NS	NS	NS	<0,05*	<0,005**

* No se detectaron diferencias significativas entre grupos.

** Se detectaron diferencias significativas entre el grupo con eritropoyesis alta y los otros dos.

c) Relación entre el grado de eritropoyesis y el patrón medular del hierro: No se observó ninguna asociación significativa (tabla 16).

Tabla 16. Relación entre el grado de eritropoyesis y el patrón medular de hierro.

Grado de eritropoyesis	Patrón medular de disposición de hierro			
	Normal	Ferropenia	Bloqueo	Sobrecarga
Alta	13 (32 %)	13 (29 %)	9 (27 %)	3 (40 %)
Normal	28 (46 %)	19 (42 %)	27 (55 %)	8 (44 %)
Baja	19 (22 %)	13 (29 %)	13 (18 %)	7 (16 %)

Chi² = 3,13; No significativo

d) Relación entre el grado de eritropoyesis y la deficiencia funcional de hierro:

Se observó una asociación significativa entre la hiperplasia eritropoyética y el índice de saturación de la transferrina menor al 20 % (tabla 17). No hay asociación significativa entre un porcentaje de sideroblastos menor al 20 % o la alarma de hipocromia y la hiperplasia eritropoyética. No se observaban diferencias significativas entre el conteaje de reticulocitos de los pacientes con o sin deficiencia funcional de hierro de acuerdo con cada uno de los tres criterios. Podía haber una tendencia a la deficiencia de hierro en la hiperplasia eritropoyética, pero que no era importante porque el incremento en el conteaje de reticulocitos entre los pacientes con deficiencia funcional con respecto a los que no la tienen no pasa de ser aproximadamente 5.000 reticulocitos por μ l.

Tabla 17. Asociación entre los parámetros marcadores de la deficiencia funcional y los grados de eritropoyesis.

Eritropoyesis	IST		Sideroblastos		AHH	
	<20%	>20%	<20%	>20%	Si	No
Alta	26 (88 %)	12	19 (50 %)	19	13 (34 %)	25
Normal	45 (55 %)	37	39 (47 %)	43	26 (32 %)	56
Baja	21 (40 %)	31	21 (40 %)	31	13 (25 %)	39
	Chi ² = 7,5		Chi ² = 1		Chi ² = 1	
	p < 0,05		NS		NS	

5.1.4.3. La calidad de la maduración de la serie roja:

a) Relación entre la actividad madurativa eritropoyética y los parámetros del metabolismo del hierro, o los del hemograma:

Los 40 pacientes con alteraciones de la maduración no presentaron diferencias significativas en las concentraciones de hierro ni en el índice de saturación de la transferrina con respecto a los 132 pacientes con maduración de la serie roja correcta a nivel medular. Sin embargo en los pacientes con alteraciones de la maduración los niveles de ferritina eran significativamente mayores (853 ± 916 ug/l frente a 412 ± 606 ug/l, $p < 0,0005$), que en aquellos pacientes con maduración correcta. Los datos quedan expuestos en la tabla 18.

Tabla 18. Los parámetros del perfil férrico y la calidad de maduración eritropoyética.

Maduración eritroide	Parámetros del perfil férrico			
	Fe ($\mu\text{g/dl}$)	Tf (mg/dl)	Ft ($\mu\text{g/l}$)	IST (%)
Correcta (n = 132)	68 ± 36	251 ± 56	412 ± 606	22 ± 13
Incorrecta (n = 40)	71 ± 52	231 ± 72	853 ± 916	25 ± 19
Valor de p	NS	<0,1	<0,001	NS

Las alteraciones de la maduración eritroide conllevaban una disminución significativa en las tasas de hemoglobina y unos valores de los parámetros de dispersión significativamente mayores. Los valores de VCM y CHCM eran superponibles entre los pacientes que presentan esta anomalía y los que no la tenían (tabla 19).

Tabla 19. Los parámetros del hemograma y la calidad de maduración eritropoyética.

Maduración eritroide	Parámetros del hemograma				
	Hb (g/dl)	VCM (fl)	CHCM (g/dl)	RDW	HDW
Correcta (n =132)	12,6±2,3	89 ± 6	32,8 ± 1,4	16,4 ± 1,9	2,8 ± 0,5
Incorrecta (n = 40)	10,7±1,7	90 ± 11	32,8 ± 1,4	17,8 ± 2,8	3,1 ± 0,6
Valor de p	<0,0001	NS	NS	<0,0001	<0,001

b) Relación con el patrón de disposición del hierro en médula ósea:

Las alteraciones de la maduración de la estirpe eritroide en médula no se asociaron a ningún patrón de disposición de hierro (tabla 20).

Tabla 20. El patrón medular de hierro y la calidad de maduración eritropoyética.

Maduración eritroide	Patrón medular de disposición de hierro			
	Normal	Ferropenia	Bloqueo	Sobrecarga
Alterada	14 (23 %)	12 (27 %)	9 (18 %)	5 (28 %)
Correcta	46	33	40	13

Chi² = 2,23; No significativo

c) Relación con el estadio de la ferropenia:

No se estableció ninguna asociación entre el estadio de la ferropenia y las alteraciones de la maduración eritroide (tabla 21).

Tabla 21. Relación entre las alteraciones de la maduración de la serie roja y el estadio de la ferropenia.

Maduración eritroide	Estadio de la ferropenia		
	Normal	F. Prelatente	F. Funcional
Alterada	14 (23 %)	5 (23 %)	8 (26 %)
Correcta	46	10	22

Chi² = 0,13; No significativo

d) Relación con la deficiencia funcional de hierro:

No se demostró ninguna asociación entre la deficiencia funcional de hierro y las alteraciones de la maduración eritroide (tabla 22).

Tabla 22. Relación entre las alteraciones de la maduración y los parámetros marcadores de la deficiencia funcional de hierro.

Maduración	IST		Sid		AHH	
	<20%	>20%	<20%	>20%	Si	No
Correcta	68	64	62	70	37	95
Alterada	24 (26 %)	16 (20%)	17 (21 %)	23 (25 %)	15 (36 %)	25 (21 %)
	Chi ² = 1,21		Chi ² = 0,49		Chi ² = 0,97	
	No significativo		No significativo		No significativo	

e) Relación con la actividad eritropoyética:

La maduración incorrecta de la serie roja estuvo asociada significativamente a la hiperplasia eritropoyética (tabla 23). El número de reticulocitos no fue significativamente diferente en los 16 pacientes con maduración incorrecta

($6,6 \pm 3,9 \times 10^4$ reticulocitos /ul) frente a los 56 pacientes sin alteraciones de maduración ($7 \pm 2,9 \times 10^4$ reticulocitos /ul).

Tabla 23. Relación entre el grado de actividad eritropoyética y la calidad de la maduración de la serie roja.

Maduración	Grado de actividad eritropoyética		
	Alta	Normal	Baja
Alterada	16 (42 %)	14 (17 %)	10 (19 %)
Correcta	22	68	42

Chi² = 8,98; p < 0,05

5.1.5. LA RESPUESTA INFLAMATORIA

a) Relación con los parámetros del perfil férrico y el hemograma:

Todos los parámetros del perfil férrico se encontraron significativamente afectados por la situación inflamatoria. Mientras que las concentraciones séricas de hierro y de transferrina, y el índice de saturación de la transferrina estaban disminuidos en la inflamación, la ferritina sérica se encontraba elevada de manera significativa (tabla 24).

Tabla 24. La respuesta inflamatoria y los parámetros del perfil férrico.

Inflamación	Grado de actividad eritropoyética			
	Fe (µg/dl)	Tf (mg/dl)	Ft (µg/l)	IST (%)
NO n = 62	72 (17–185) 80,3 ± 40,3	252 (114–442) 257 ± 55	171 (2–2592) 300 ± 411	22 (6–91) 26 ± 16
SI n = 60	48 (11–159) 55,0 ± 34,8	216 (128–384) 222 ± 58	474 (81–4450) 767 ± 854	16 (4–77) 20 ± 12
p (t student)	<0,0005	<0,001	<0,0005	<0,0005

En cuanto al hemograma los pacientes con inflamación tenían unas tasas de hemoglobina significativamente menores y una RDW significativamente mayor (tabla 25).

Tabla 25. La respuesta inflamatoria y los parámetros del hemograma.

Inflamación	Parámetros del hemograma				
	Hb (g/dl)	VCM (fl)	CHCM (g/dl)	RDW	HDW
NO n = 62	13,1±2,1	89 ± 8	32,9 ± 1,4	15,2 ± 2,5	2,8 ± 0,6
SI n = 60	10,9±1,9	89 ± 7	32,5 ± 1,4	16,3 ± 2,7	2,9 ± 0,6
p (t student)	<0,0001	NS	<0,1	<0,05	NS

b) Relación con la disposición de hierro en médula ósea y con el estadio de la ferropenia.

El proceso inflamatorio se encontraba significativamente asociado a los patrones de bloqueo y sobrecarga (tabla 26). No se detectó ninguna asociación entre la inflamación, la ferropenia y su estadio (tabla 27).

Tabla 26. Relación entre la respuesta inflamatoria y el patrón medular.

Estado	Patrón medular de disposición de hierro			
	Normal	Ferropenia	Bloqueo	Sobrecarga
No inflamación	30 (64 %)	18 (58 %)	9 (27 %)	6 (54 %)
Inflamación	17	13	24	5

Chi² = 11,28; p < 0,05

Tabla 27. La respuesta inflamatoria y el estadio de la ferropenia.

Estado	Estadio de la ferropenia		
	Normal	F. Prelatente	F. Funcional
No inflamación	30 (64 %)	7 (70 %)	11 (52 %)
Inflamación	17	3	10

Chi² = 1,15; No significativo

c) Relación con la deficiencia funcional de hierro.

La inflamación se asociaba significativamente a un índice de saturación de la transferrina menor del 20 %, y a un porcentaje de sideroblastos menor del 20%. No se detectó asociación significativa entre la inflamación y la alarma de hipocromia (tabla 28).

Tabla 28. La respuesta inflamatoria y los parámetros marcadores de la deficiencia funcional de hierro.

Inflamación	IST		Síd		AHH	
	<20%	<20%	<20%	<20%	Si	No
Si	42(64 %)	18 (32 %)	34 (63 %)	26 (38 %)	22 (56 %)	38 (45 %)
No	24	38	20	42	17	45
	Chi ² = 11,24		Chi ² = 7,36		Chi ² = 1,20	
	p < 0,001		p < 0,01		No significativo	

d) Relación con el proceso eritropoyético.

En nuestros pacientes la inflamación se asoció significativamente con una actividad eritropoyética hiperplasiada (tabla 29). No se detectó

asociación significativa entre el proceso inflamatorio y la calidad de la maduración de la serie roja (tabla 30).

Tabla 29. Relación entre la respuesta inflamatoria y el grado de actividad eritropoyética.

Inflamación	Grado de actividad eritropoyética		
	Alta	Normal	Baja
Si	19 (70 %)	32 (54 %)	22 (61 %)
No	8	27	14

$\text{Chi}^2 = 6,52; p < 0,05$

Tabla 30. Relación entre la respuesta inflamatoria y las alteraciones de la maduración.

Inflamación	Maduración de la serie roja	
	Correcta	Alterada
Si	50 (54 %)	12 (40 %)
No	42	18

$\text{Chi}^2 = 0,172; \text{ No significativo.}$

5.2. Estudio de las variaciones en la concentración sérica de sTfR:

5.2.1. RELACIÓN CON CADA VARIABLE:

5.2.1.1. El patrón de disposición del hierro en médula ósea:

El patrón de disposición del hierro en médula ósea ejercía una influencia significativa en los niveles de sTfR ($p < 0,05$). Pero sólo se detectaron diferencias entre los pacientes con patrón de bloqueo y de sobrecarga. En todos los grupos se encontraban pacientes con niveles elevados de sTfR, y no fué posible diferenciar a los pacientes ferropénicos con este parámetro.

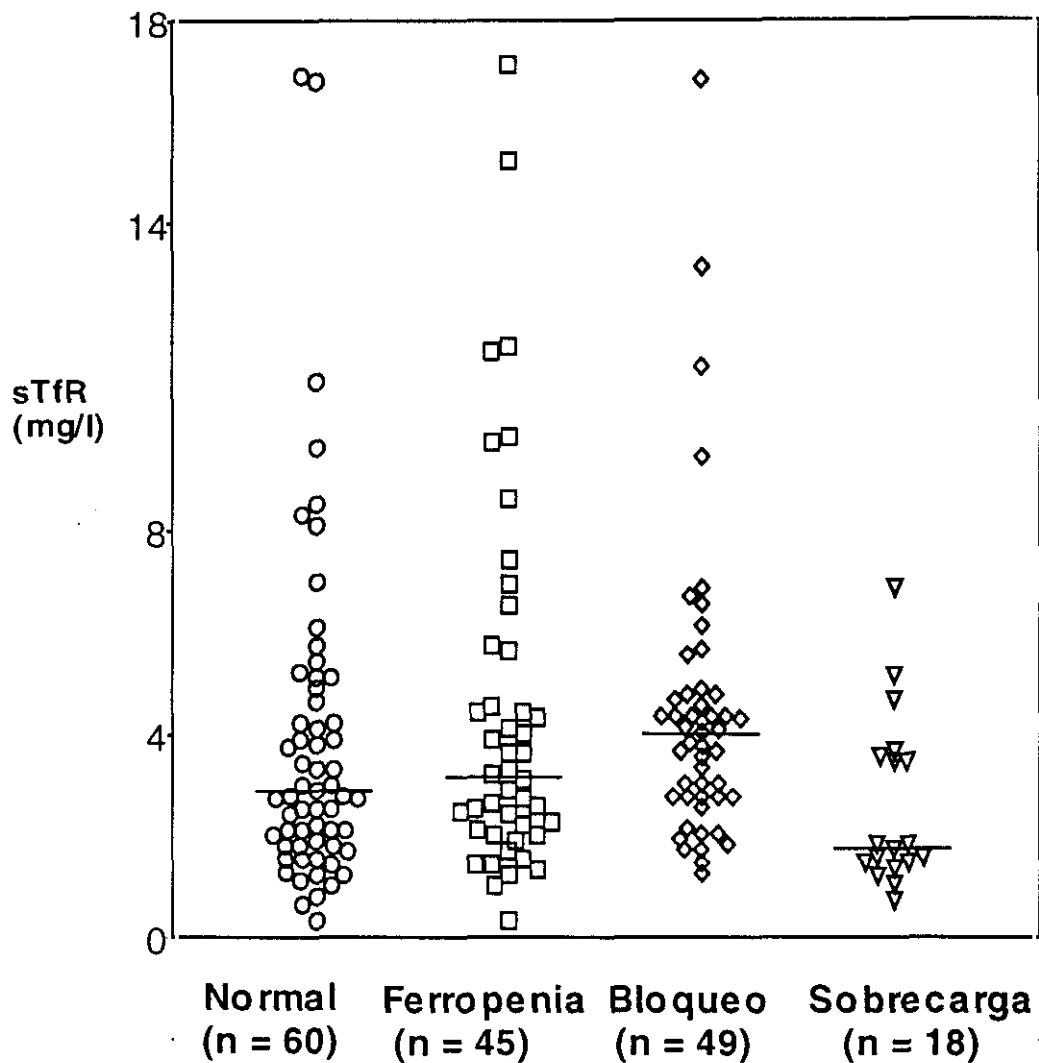
Los 60 pacientes con patrón normal tenían una mediana de sTfR de 2,8 mg/l y un rango de 0,3 a 16,9 mg/l. Los 45 pacientes ferropénicos tenían una mediana de 3,2 mg/l y un rango de 0,3 a 17,1 mg/l. Los 49 pacientes con patrón de bloqueo presentaban una mediana de 4,2 mg/l y un rango de 1,2 a 16,8 mg/l. Los 18 pacientes con patrón de sobrecarga tenían una mediana de 1,8 mg/l y un rango de 0,7 a 6,8 mg/l. Los datos quedan ilustrados en la figura 17.

Estudiando los 95 pacientes con anemia, los niveles de sTfR de los ferropénicos no eran significativamente diferentes que en aquellos que tenían suficiente hierro en depósito. La mediana y rango de sTfR era para los primeros 4 (0,8 a 15,2) mg/l, y para los segundos 4 (0,4 a 16,9) mg/l. El ratio sTfR/log de Ferritina presentaba el mismo comportamiento.

5.2.1.2. La deficiencia funcional de hierro:

Los pacientes que tenían deficiencia funcional de hierro de acuerdo a cualquiera de los tres criterios utilizados presentaron niveles de sTfR significativamente superiores a aquellos pacientes que no tenían deficiencia (figura 18 y tabla 32).

Figura 17. Niveles de sTfR en los diferentes grupos de disposición del hierro en médula ósea.

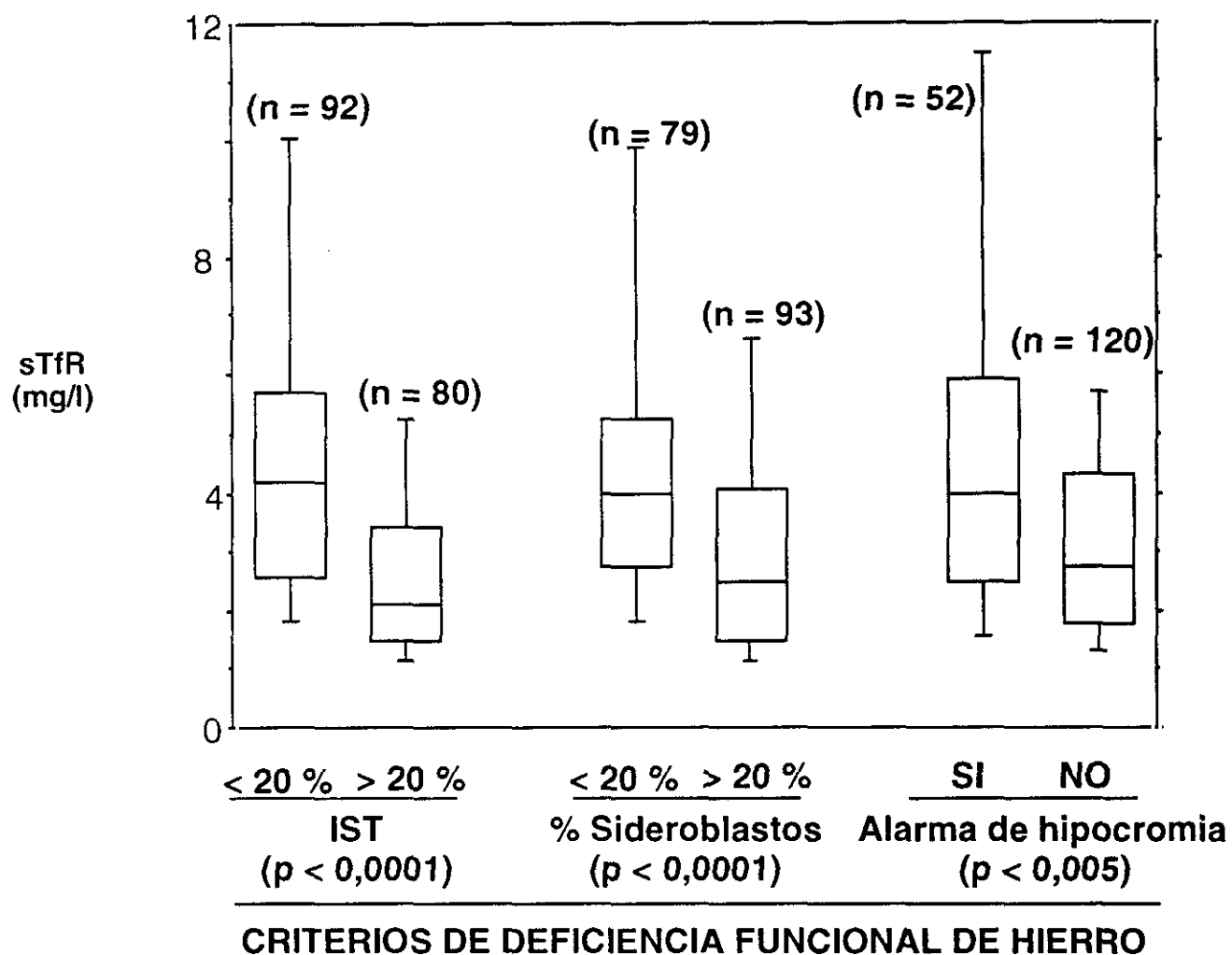


PATRONES DE DISPOSICIÓN DEL HIERRO EN MÉDULA ÓSEA

Kruskal-Wallis $p < 0,05$.

En cada grupo se ha marcado la mediana

Figura 18. Influencia de la existencia o no de deficiencia funcional de hierro en la concentración de sTfR.



Los pacientes con deficiencia funcional de hierro de acuerdo a cualquiera de los tres criterios, presentan niveles de sTfR significativamente superiores a los que no presentan esta anomalía.

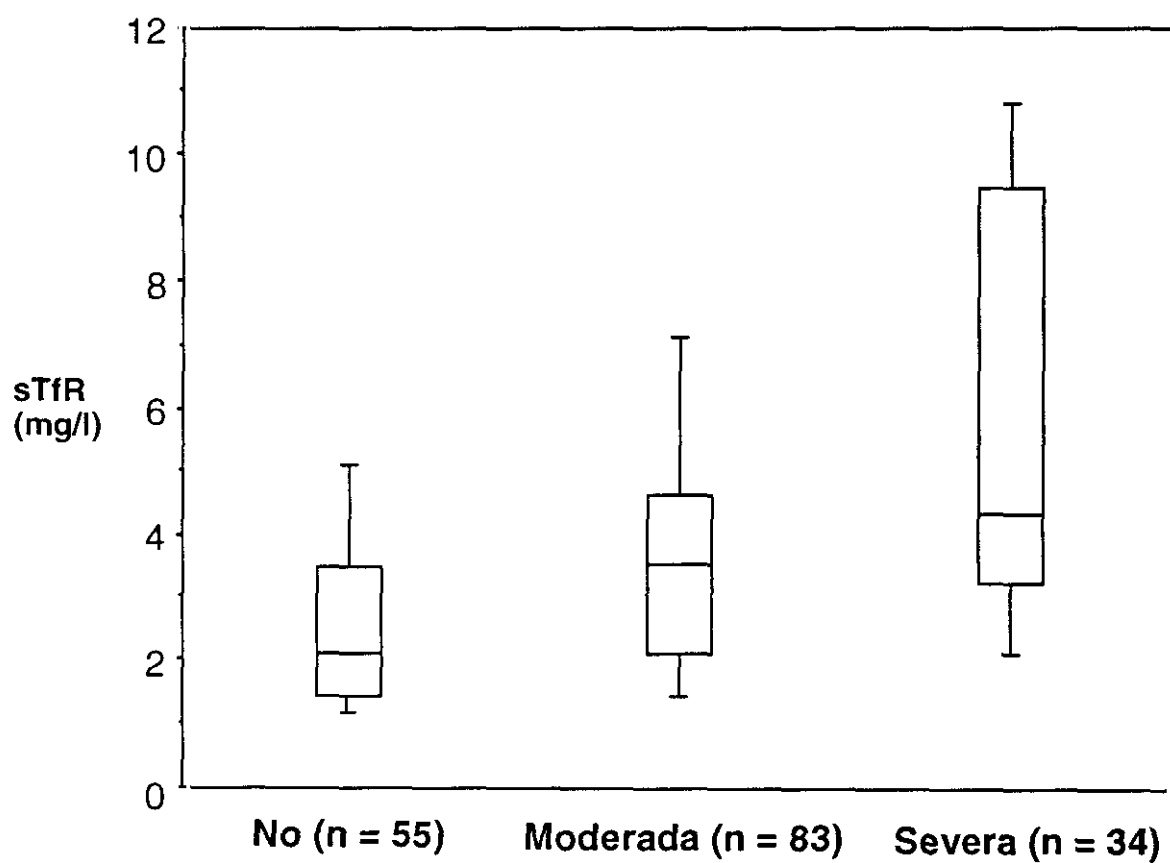
Tabla 32. Los niveles de sTfR en los pacientes con o sin deficiencia funcional de hierro de acuerdo a cada uno de los tres criterios.

Status	Concentración de sTfR (mg/l)		
	IST	Sid	AHH
D. Funcional	4,2 (0,6 – 17,7)	4 (0,3 – 17,1)	4 (0,6 – 17,1)
	5 ± 3,6	4,8 ± 3,5	5,5 ± 4,2
	n = 92	n = 79	n = 52
No D. Funcional	2,2 (0,3 – 16,8)	2,5 (0,3 – 16,6)	2,8 (0,3 – 16,8)
	2,9 ± 2,4	3,4 ± 2,9	3,4 ± 2,5
	n = 80	n = 93	n = 120
Valor p	< 0,0001	< 0,005	< 0,0001

D. Funcional: Deficiencia funcional, No D. Funcional: No deficiencia funcional.

El grado de deficiencia funcional también influyó significativamente en los niveles de sTfR ($p < 0,0001$). Los pacientes sin deficiencia funcional presentaron niveles inferiores, que aquellos que tenían deficiencia funcional moderada, y a su vez, estos tenían menores concentraciones de sTfR que los pacientes con deficiencia funcional severa. Los valores de las medianas y rangos de sTfR por grupos fueron para los 55 pacientes sin deficiencia funcional 2,1 (0,3 - 16,8) mg/l, para los 83 pacientes con deficiencia funcional moderada de 3,5 (0,3 - 16,9) mg/l, y para los 34 pacientes con deficiencia funcional severa 4,3 (1,7 - 16,1). Se ilustran los datos en la figura 19.

Figura 19. Las concentraciones de sTfR en los diferentes grados de deficiencia funcional de hierro.



Grado de deficiencia funcional

ANOVA (p < 0,0001)

Se observó un aumento progresivo en la concentración de sTfR, en relación con el grado de deficiencia funcional de hierro.

5.2.1.3. El estadio de la ferropenia:

El estadio de la ferropenia se relacionaba significativamente con los niveles de sTfR ($p < 0,005$). Los pacientes con ferropenia funcional presentaban niveles de sTfR superiores a los pacientes sin ferropenia, pero también a los pacientes con ferropenia latente. Entre estos dos últimos grupos no había diferencias significativas. Las medianas y rangos de los grupos eran las siguientes: en los 60 pacientes sin ferropenia 2,8 mg/l (0,3 a 16,9 mg/l), en los 15 pacientes con ferropenia latente 1,9 mg/l (1 a 6,5 mg/l), y en los 30 pacientes con ferropenia funcional 4,1 mg/l (0,3 a 17,1 mg/l). Se detallan gráficamente los datos en la figura 20.

5.2.1.4. La eritropoyesis:

a) El grado de actividad eritropoyética:

Este factor determinaba significativamente en los valores de sTfR ($p < 0,0001$) y de manera similar al grado de deficiencia funcional. Los niveles de sTfR fueron significativamente más altos, cuanto mayor era el grado de eritropoyesis. Las medianas y rangos de sTfR de los diferentes grados de eritropoyesis eran: en los 5 pacientes con eritropoyesis baja 2,2 (0,3 - 5,1) mg/l, en los 82 pacientes con eritropoyesis normal 3 (1 - 16,8) mg/l, y en los 8 pacientes con eritropoyesis hiperplasiada 4,2 (1,2 - 17,1) mg/l. Estos datos se reflejan en la figura 21.

b) El conteo de reticulocitos:

En los 82 pacientes en los que se disponía de la cifra de reticulocitos, el sTfR y este parámetro presentaban una moderada correlación de $r^2 = 0,37$ (figura 22).

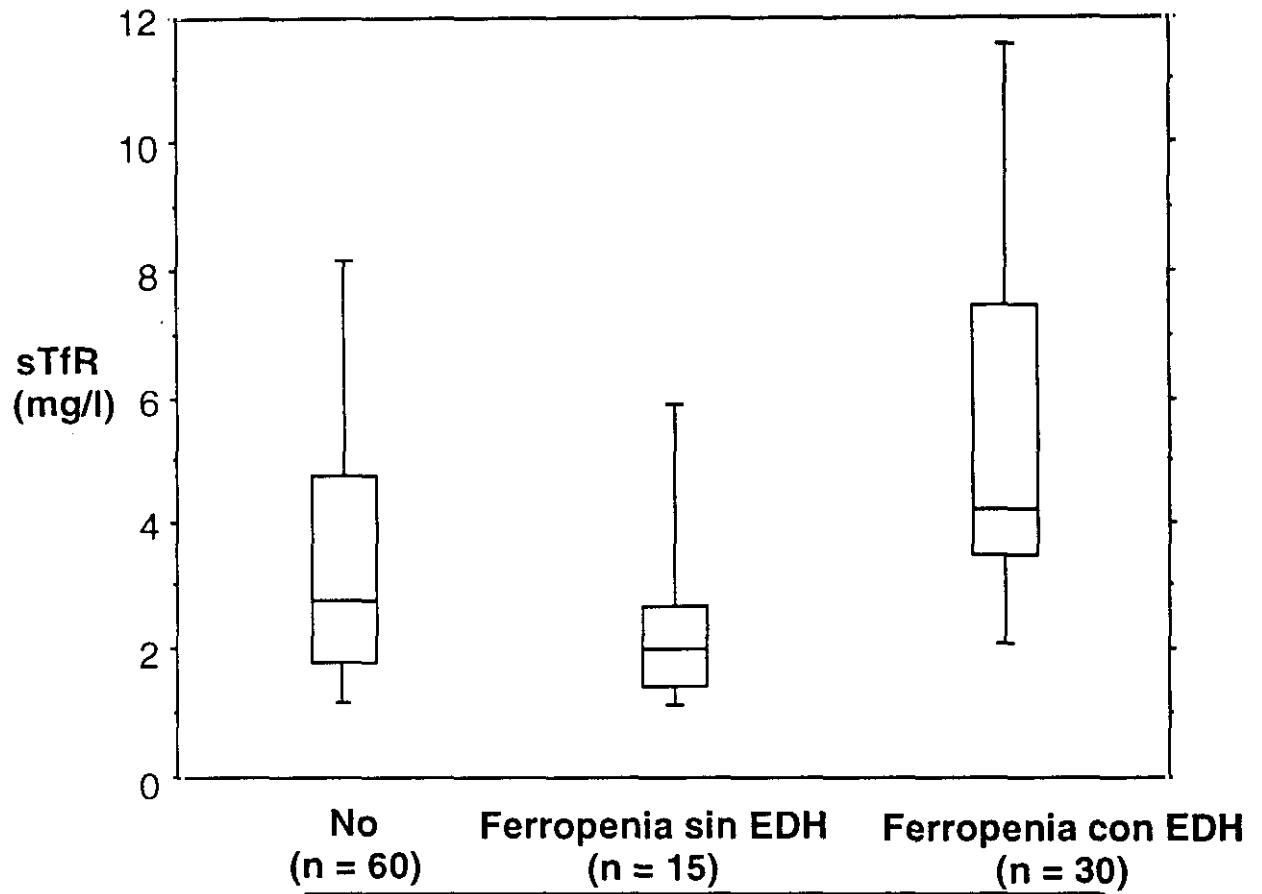
c) Las alteraciones de la maduración de la serie roja:

No se detectaron diferencias significativas en los niveles de sTfR entre los 132 pacientes con maduración de la serie roja correcta (mediana de 3 mg/l y rango de 0,3 a 17,1 mg/l) y los 40 pacientes con alteraciones en la maduración de la serie roja (mediana de 3,4 mg/l y rango de 0,3 a 11,5 mg/l). Se exponen los datos en la figura 23.

5.2.1.5. La inflamación:

Los 62 pacientes con inflamación tenían unos niveles de sTfR significativamente inferiores que los 60 pacientes con inflamación ($p < 0,01$). La mediana y rango de las concentraciones de sTfR para el primer grupo era 2,6 mg/l (0,3 a 16,9 mg/l), y para el segundo 4,1 mg/l (0,3 a 15,2 mg/l). Los datos quedan expuestos en la figura 24.

Figura 20. Las concentraciones de sTfR en los distintos estadios de la ferropenia.

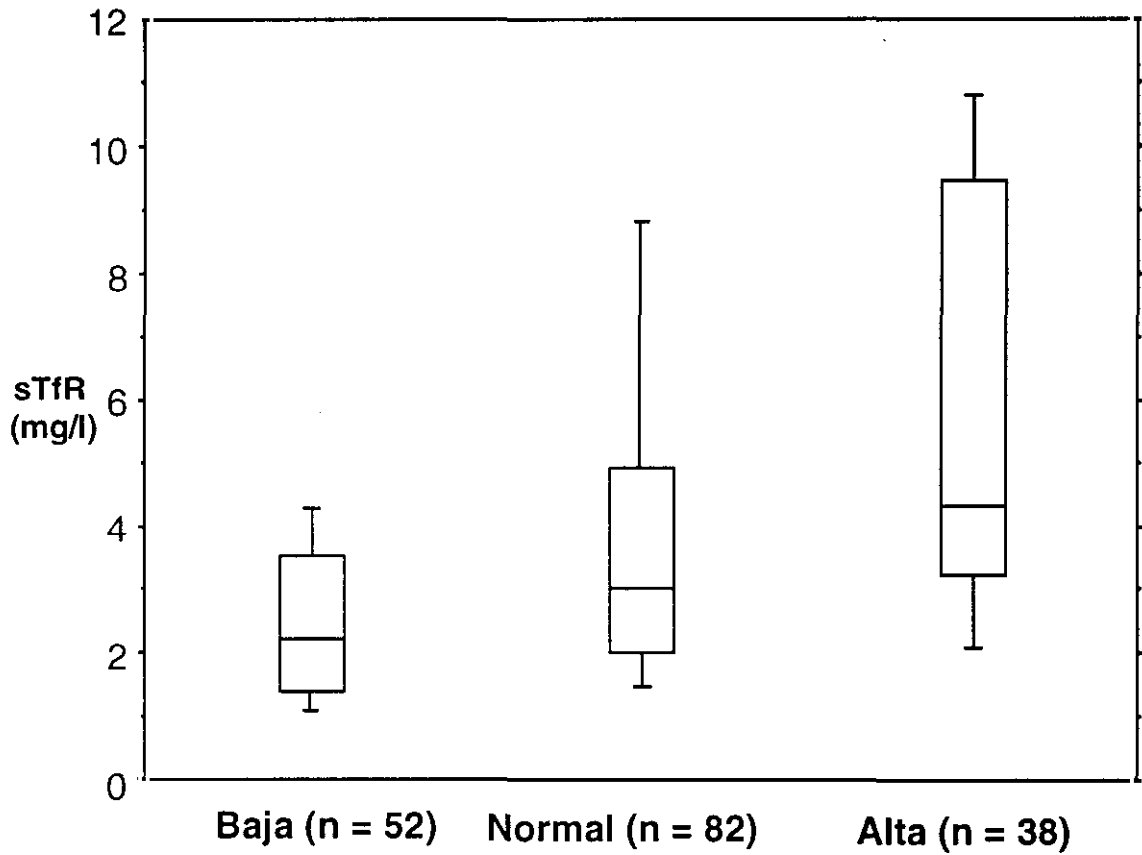


Grado de deficiencia funcional

ANOVA ($p < 0,05$)

El sTfR se eleva significativamente en el estadio de ferropenia funcional, asociada a eritropoyesis deficiente en hierro.

Figura 21. Las concentraciones de sTfR en los diferentes grados de actividad eritropoyética.



Actividad eritropoyética

ANOVA ($p < 0,0001$)

Los niveles de sTfR aumentan significativamente, cuando mayor es el grado de actividad eritropoyética.

Figura 22. Relación entre la concentración de sTfR y el recuento de reticulocitos.

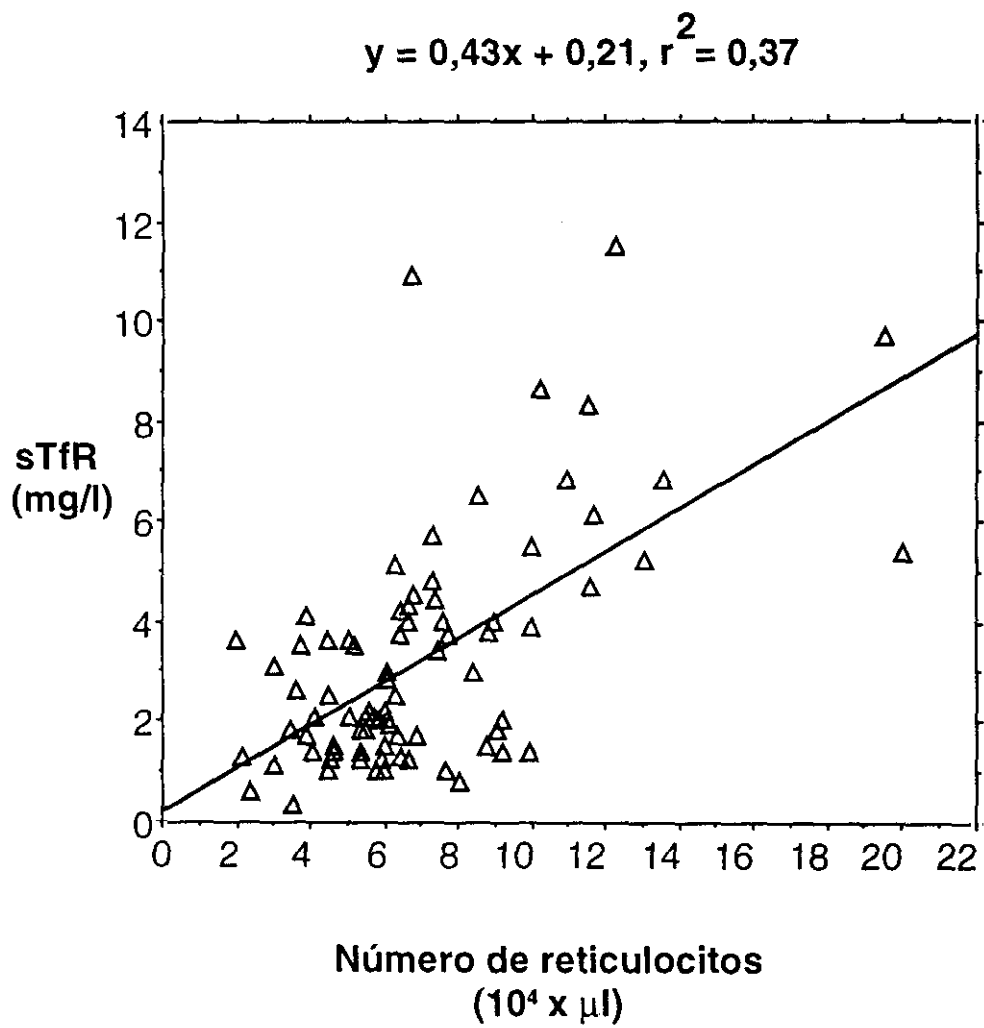
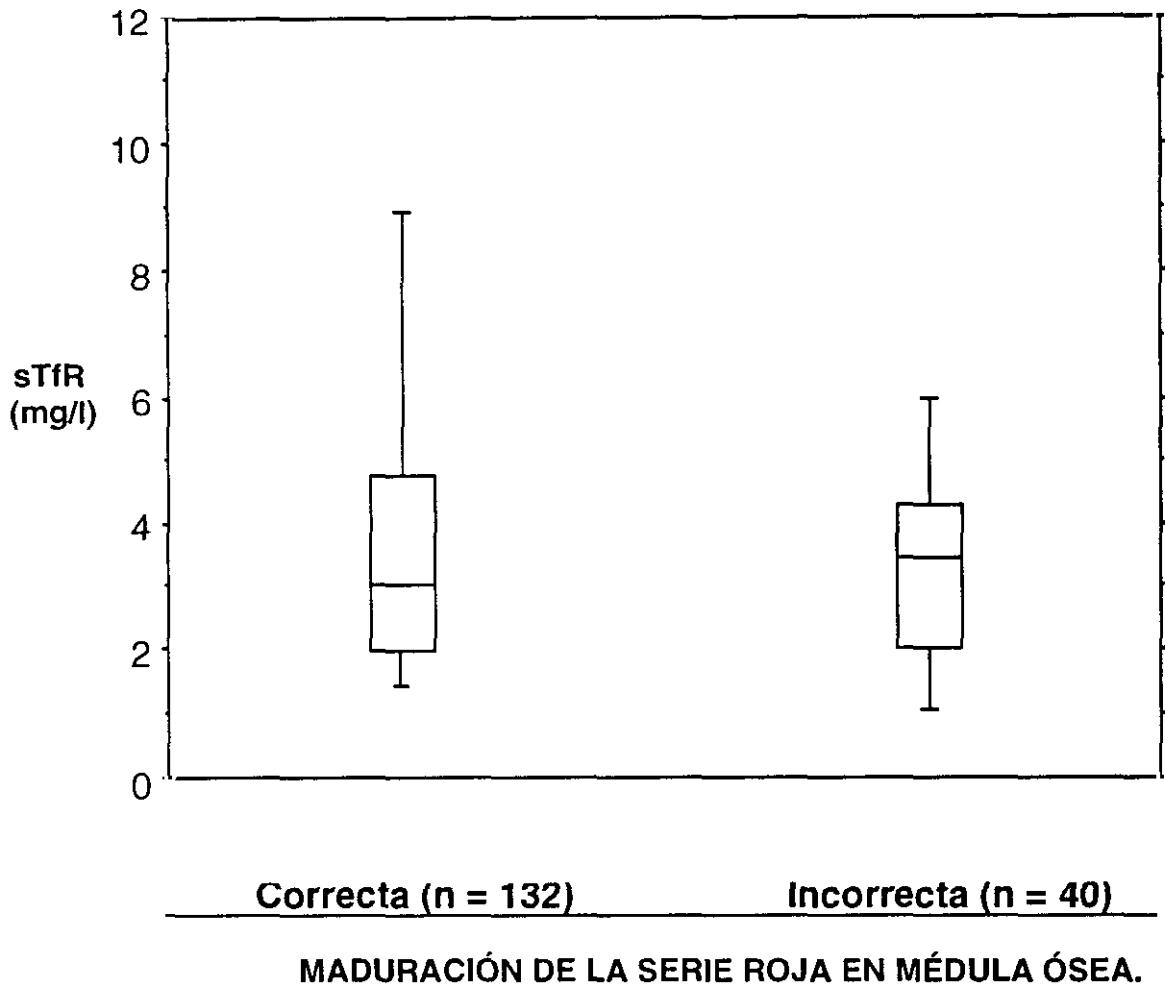
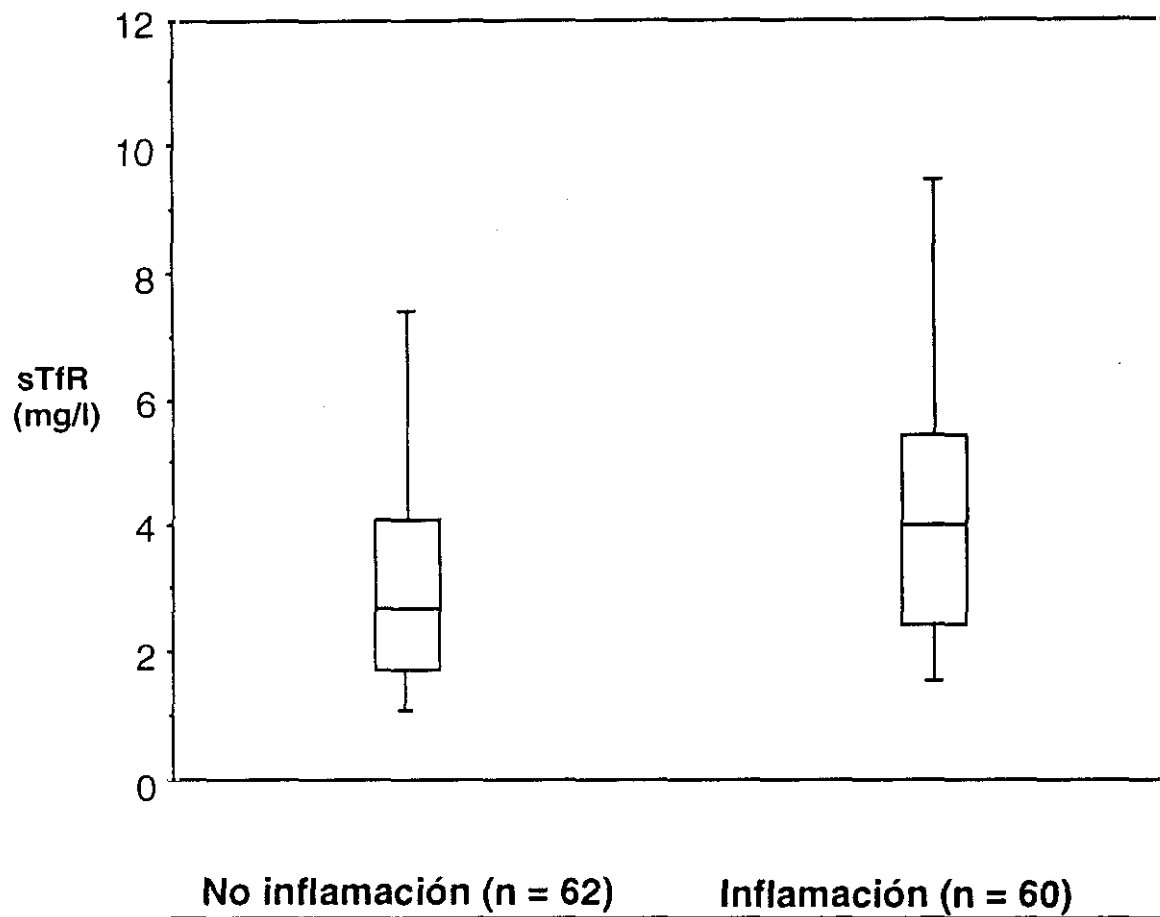


Figura 23. Las concentraciones de sTfR en función de la calidad de la maduración de la serie roja.



No se detectan diferencias significativas en las concentraciones de sTfR, entre los pacientes con maduración correcta o patológica de la serie roja.

Figura 24. Las concentraciones de sTfR en presencia o ausencia de proceso inflamatorio.



U de Mann Withney $p < 0,01$.

Los niveles de sTfR se encuentran significativamente mas elevados en los pacientes con procesos inflamatorios.

5.2.2. INFLUENCIA REAL DE LAS VARIABLES

5.2.2.1. Los modelos lineales generalizados:

Las variables que ejercían influencia real sobre los niveles de sTfR fueron el grado de eritropoyesis, el grado de deficiencia funcional de hierro y en menor medida las alteraciones en la maduración de la serie roja. No se demostró influencia significativa ni para el patrón medular de disposición del hierro, ni para la inflamación. Los datos del estudio con esta prueba estadística están recogidos en la tabla 33.

Tabla 33. Análisis de la influencia verdadera de cada una de las variables estudiadas en los niveles de sTfR mediante los modelos lineales generalizados.

MODELOS LINEALES GENERALIZADOS				
Variable	Categorías	Coficiente	E. estandar	Probabilidad
Deficiencia	No	- 3,43	0,96	< 0,0005
	Moderada	- 1,92	0,75	< 0,05
	Severa	0	-	-
Patrón mo	Normal	0,68	1,52	No significativo
	Ferropenia	0,59	1,57	No significativo
	Bloqueo	-0,61	1,6	No significativo
	Sobrecarga	0	-	-
Eritropoyesis	Alta	2,67	0,78	< 0,001
	Normal	1,63	0,62	< 0,01
	Baja	0		
Maduración	Correcta	0		
	Incorrecta	-1,59	0,62	< 0,05
Inflamación	No	0		
	Si	- 0,40	0,60	No significativo

5.2.2.2. Estudio detallado de cada factor:

a) El grado de actividad eritropoyética y el grado de deficiencia funcional de hierro:

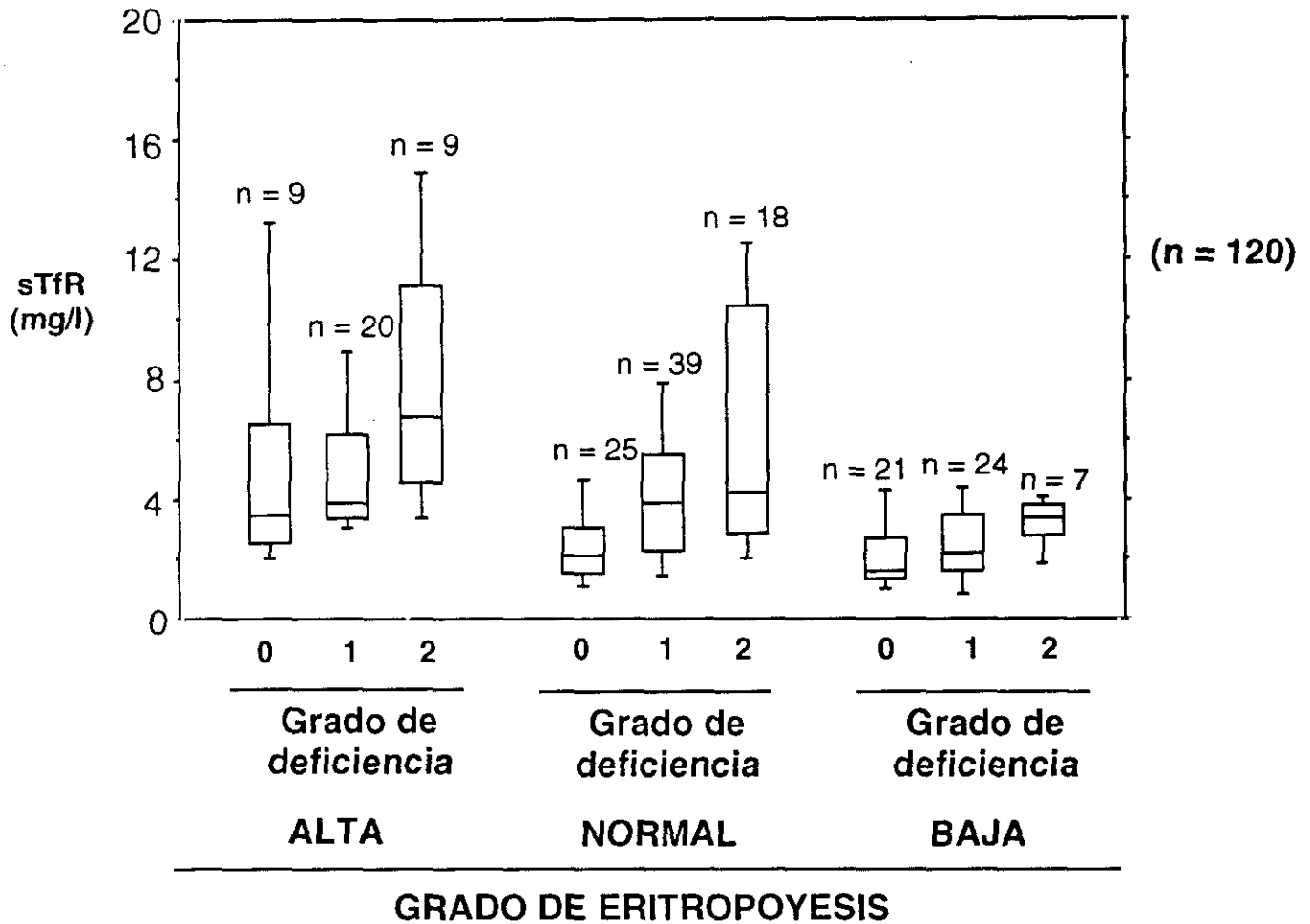
Ambos factores influyen de manera muy significativa en los niveles de sTfR (ANOVA con $p < 0,001$ para los dos factores). Y lo hacen de manera independiente (ANOVA grado de eritropoyesis - grado de deficiencia no significativo). Los datos cuantitativos quedan reflejados en la tabla 34 y en la figura 25.

Tabla 34. Influencia del grado de deficiencia funcional de hierro y el grado de actividad eritropoyética en las concentraciones de sTfR (mg/l).

Grado de deficiencia	Grado de actividad eritropoyética		
	Alta (n = 38)	Normal (n = 82)	Baja (n = 52)
No deficiencia (n = 55)	3,4 (2-16,8) (n = 9)	2,1 (1-5,4) (n = 25)	1,7 (0,3-5,1) (n = 21)
Deficiencia moderada (n = 83)	3,9 (1,2-16,9) (n = 20)	3,9 (1-15,2) (n = 39)	2,3 (0,3-5,1) (n = 24)
Deficiencia severa (n = 34)	6,8 (3,2-17,1) (n = 9)	4,4 (1,8-16,8) (n = 18)	3,6 (1,7-4,3) (n = 7)

ANOVA Grado de eritropoyesis $p < 0,0001$;
ANOVA Grado de deficiencia $p < 0,001$;
ANOVA Grado de eritropoyesis-Grado de deficiencia No significativo.

Figura 25. Influencia del grado de deficiencia funcional de hierro, y del grado de eritropoyesis, en los niveles de sTfR.



ANOVA ERITROPOYESIS $p < 0,0001$; GRADO DE DEFICIENCIA $p < 0,01$; ERITROPOYESIS-GRADO DE DEFICIENCIA NO SIGNIFICATIVO

- 0 Pacientes sin deficiencia funcional de hierro
- 1 Pacientes con deficiencia funcional de hierro moderada.
- 2 Pacientes con deficiencia funcional de hierro severa.

b) Las alteraciones de la maduración de la serie roja.

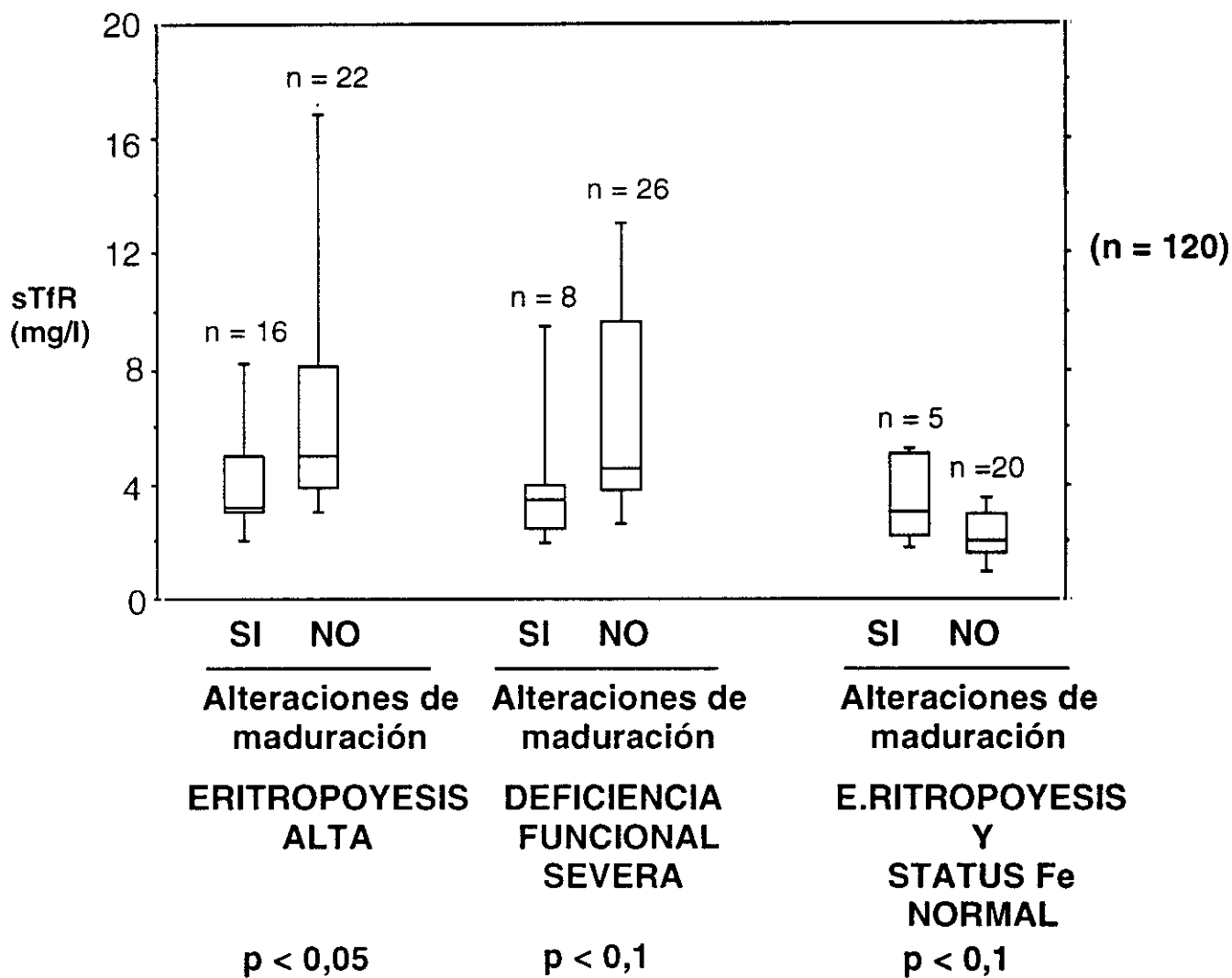
En el estudio inicial observábamos que los pacientes con alteraciones de maduración no presentaban concentraciones de sTfR significativamente diferentes a las de aquellos con una maduración correcta, pero que esta disfunción sí se encontraba asociada a una actividad eritropoyética hiperplasiada. En el estudio de los modelos lineales generalizadas se demuestra estadísticamente, que, las alteraciones de la maduración de la serie roja, si condicionan significativamente los niveles de sTfR. Para estudiar esta influencia analizamos las concentraciones de sTfR en las siguientes situaciones (figura 26).

-La hiperplasia eritropoyética: Si estudiábamos a los 38 pacientes que presentaban hiperplasia eritropoyética, se detectaban niveles de sTfR significativamente inferiores ($p < 0,05$) en los 16 que además presentaban alteraciones en la maduración de la serie roja (mediana de 3,6 mg/l y rango de 1,2 a 1,5 mg/l), que en los 22 que no presentaban alteraciones de maduración (mediana de 5,5 mg/l y rango de 2 a 17,1 mg/l).

-La deficiencia funcional severa: Estudiando a los 34 pacientes que presentaban esta situación, los niveles de sTfR de los 8 pacientes con alteraciones de maduración, eran casi significativamente menores que los de los 26 pacientes sin alteraciones de la maduración ($p < 0,1$). Las medianas y rangos de los dos grupos fueron para el primer grupo 3,4 mg/l y un rango de 1,8 a 11,5 mg/l y para el segundo grupo 4,7 mg/l y un rango de 1,7 a 17,1 mg/l.

-Eritropoyesis cuantitativamente normal y sin deficiencia funcional: En esta otra situación los niveles de sTfR de los 5 pacientes con alteraciones de la maduración eran casi significativamente mayores que los de los 20 pacientes sin alteraciones de la maduración ($p < 0,1$). Las medianas y rangos de sTfR de los distintos grupos fueron para el primer caso 3,3 mg/l (1,8 a 5,4 mg/l) y en el segundo 1,9 mg/l (1 a 4,6 mg/l).

Figura 26. Influencia de las alteraciones en la maduración de la serie roja en el comportamiento del sTfR.



El comportamiento del sTfR en los pacientes con diseritropoyesis es diferente. Los niveles son significativamente inferiores en la hiperplasia eritropoyética. En la deficiencia funcional parece ocurrir igual, aunque en nuestro estudio no se llegó a alcanzar significación estadística en este último caso. En pacientes con un grado de actividad eritropoyética normal y sin deficiencia de hierro, los niveles basales de sTfR de los pacientes con alteraciones de la maduración, parecen estar por encima de lo normal, aunque también en este caso, no se alcanzó significación estadística.

c) El status férrico:

Se estudió excluyendo aquellos pacientes con alteraciones cuantitativas o cualitativas de la eritropoyesis que alteren los niveles de sTfR.

-El patrón medular del hierro:

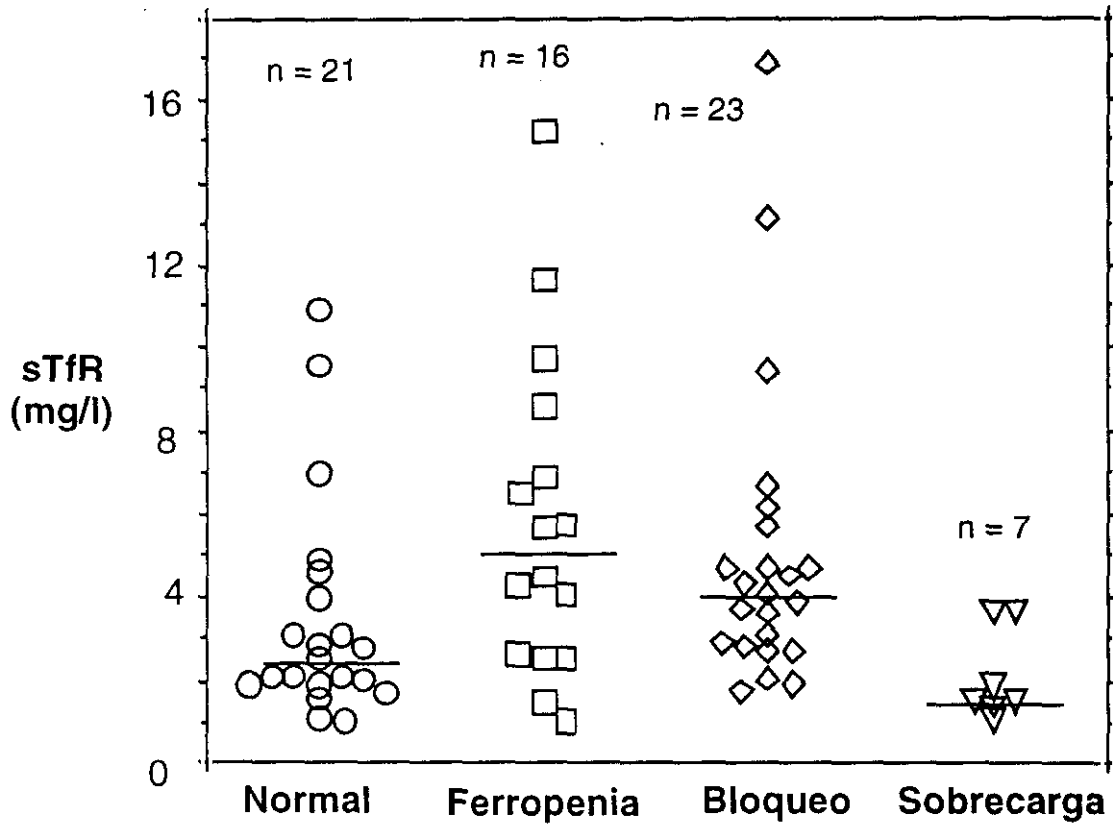
Se detectaron diferencias entre los grupos de ferropenia y sobrecarga, y de bloqueo y sobrecarga ($p < 0,005$). Las medianas y rangos de los diferentes grupos fueron, para los 21 pacientes con patrón normal 2,5 mg/l (1 a 10,9 mg/l), para los 16 pacientes con ferropenia 5,1 mg/l (1 a 15,2 mg/l), para los 23 pacientes con patrón de bloqueo 4 mg/l (1,7 a 16,8 mg/l), y para los 7 pacientes con patrón de sobrecarga 1,5 mg/l (1 a 3,6 mg/l). Los datos se ilustran en la figura 27.

Al comparar los valores de sTfR de los 23 pacientes con anemia ferropénica, y de los de un grupo de control formado por 29 pacientes sin anemia ni ferropenia, eritropoyesis normal y maduración correcta, se observaban niveles significativamente más elevados de sTfR en los pacientes con anemia ferropénica que en el grupo control ($p < 0,005$). Las medianas y rangos eran para el primer grupo 4 (0,3 a 15,2) mg/l, y para el segundo 2,7 (0,4 a 10,9). Los datos están ilustrados en la figura 28.

-El estadio de la ferropenia:

El estadio de la ferropenia influía significativamente en los niveles de sTfR ($p < 0,05$). Se detectaban diferencias significativas entre los pacientes sin ferropenia y los pacientes con ferropenia funcional. Los pacientes con ferropenia latente presentaron niveles de sTfR similares a aquellos pacientes sin ferropenia. Sin embargo sólo se observaban diferencias significativas entre el grupo de pacientes sin ferropenia y el de aquellos con ferropenia funcional. Los valores de medianas y rangos de sTfR eran para los 21 pacientes sin ferropenia 2,5 mg/l (1 a 10,9 mg/l), para los 5 pacientes con ferropenia latente 2,6 mg/l (1 a 6,5 mg/l), y para los 11 pacientes con ferropenia funcional 5,6 mg/l (2,5 a 15,2 mg/l). Los datos están reflejados en la figura 29.

Figura 27. Niveles de sTfR por patrones de distribución del hierro en médula.

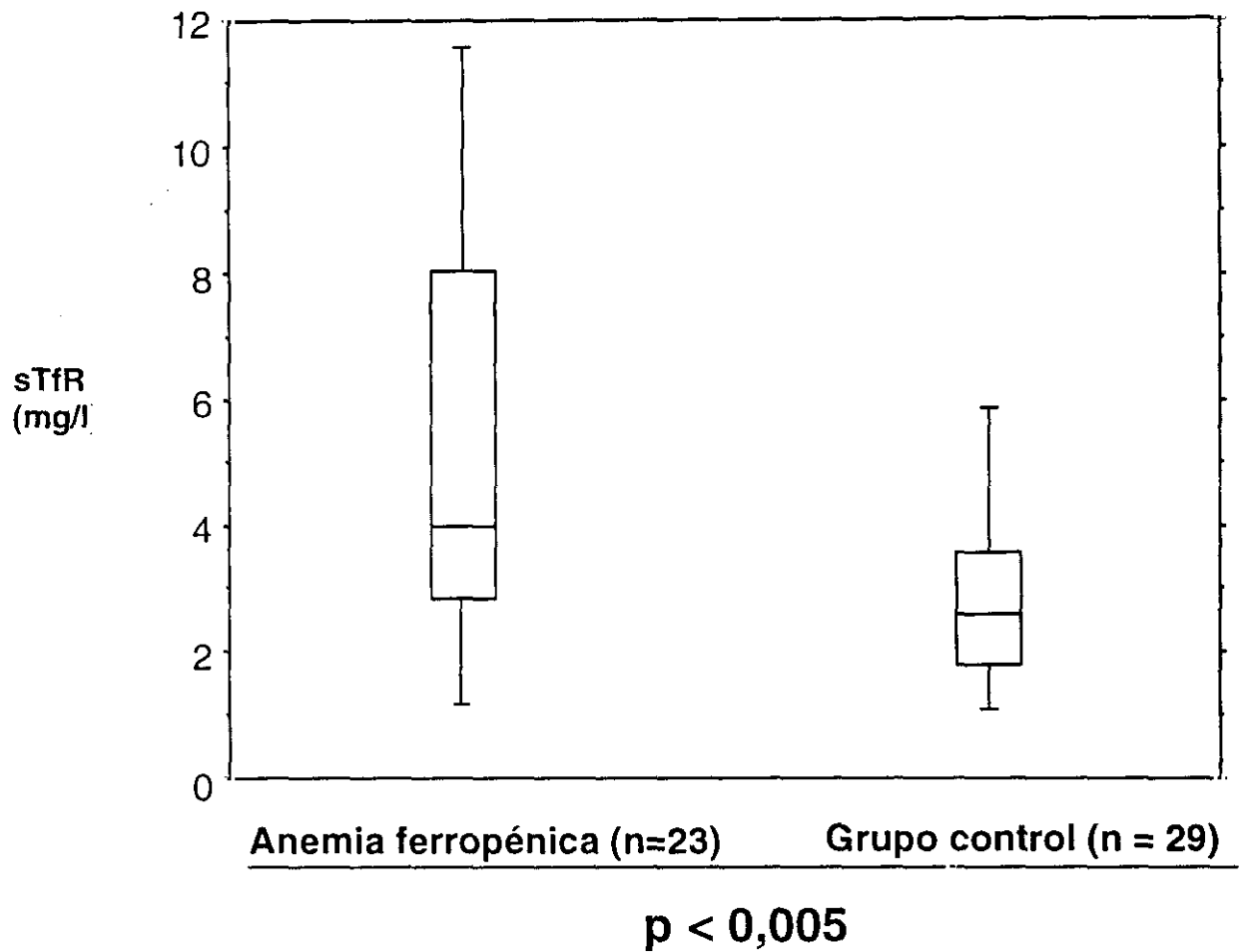


Kruskall Wallis $p < 0,01$

Se han excluido aquellos pacientes con hipoplasia, o hiperplasia eritropoyética, y aquellos con alteraciones en la maduración de la serie roja.

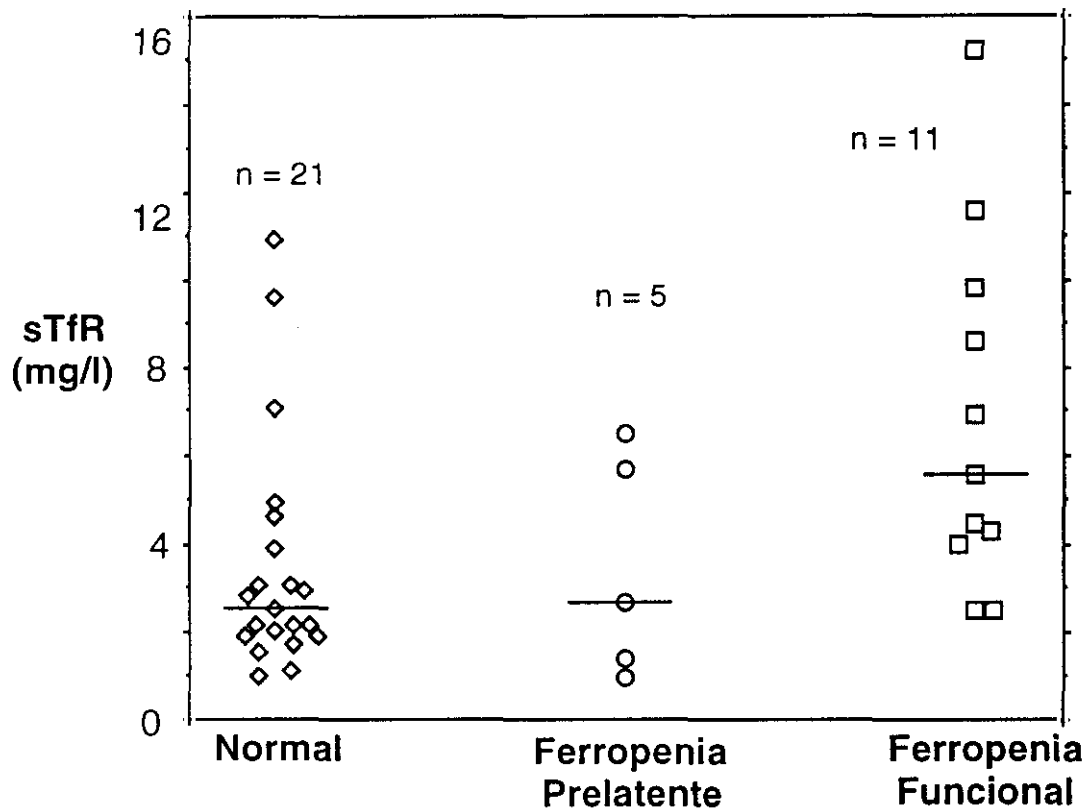
Están marcadas las medianas en todos los grupos.

Figura 28. Las concentraciones de sTfR en pacientes con anemia ferropénica frente a un grupo control.



El grupo control estaba formado por pacientes sin anemia ni ferropenia, ni situaciones eritropoyéticas que alteren los valores de sTfR.

Figura 29. Niveles de sTfR en los distintos estadios de la ferropenia.



Kruskall Wallis $p < 0,05$

Se han excluido los pacientes con hipoplasia, o hiperplasia eritropoyética, y aquellos con alteraciones en la maduración de la serie roja.

Están señaladas las medianas de los grupos.

-La deficiencia funcional no asociada a ferropenia:

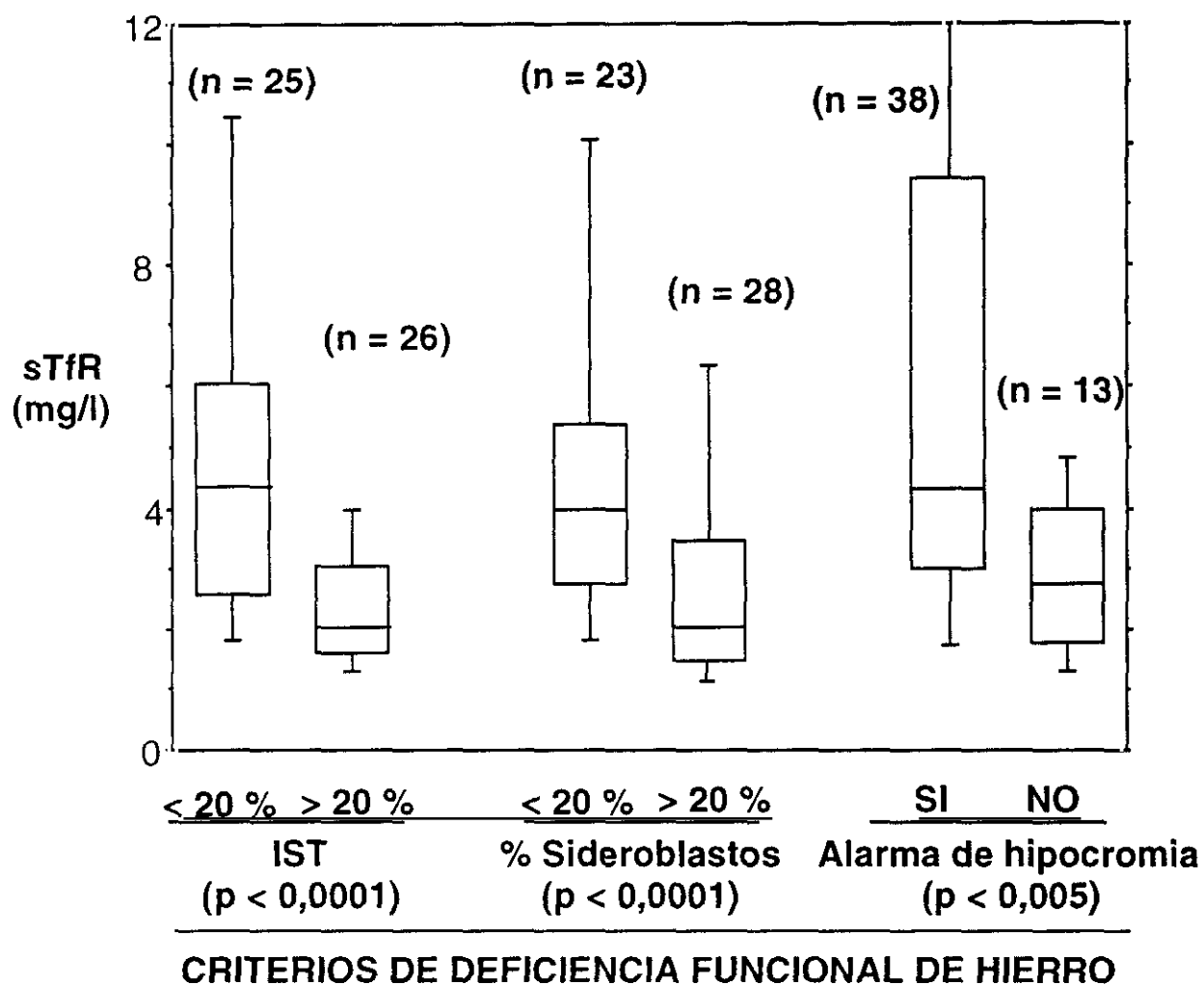
Cuando para estudiar la relación de la deficiencia funcional y los niveles de sTfR excluíamos a los pacientes ferropénicos, se seguían detectando niveles de sTfR significativamente más elevados en los pacientes con deficiencia funcional de hierro por cada uno de los tres criterios (tabla 35 y figura 30). Y también en este caso se observaba una vinculación significativa entre el grado de deficiencia funcional y los niveles de sTfR ($p < 0,05$). Las medianas y rangos de los valores de sTfR eran: para los 17 pacientes sin deficiencia funcional 2 mg/l (1 a 4,6 mg/l), para los 26 pacientes con deficiencia funcional moderada 3,2 mg/l (1 a 10,9 mg/l), y para los 8 pacientes con deficiencia funcional severa 5,5 mg/l (1,9 a 16,8 mg/l). Los datos están ilustrados en la figura 31.

Tabla 35. Niveles de sTfR (mg/l) en pacientes no ferropénicos con deficiencia o sin deficiencia funcional de hierro.

Status	sTfR (mg/l)		
	IST	Sid	AHH
D. Funcional	4,4 (1 – 16,8) (n = 26)	4 (1,7 – 16,8) (n = 23)	4,2 (1,5 – 16,8) (n = 13)
No D. Funcional	2,1 (1 – 9,6) (n = 25)	2,1 (1 – 10,9) (n = 28)	2,7 (1 – 10,9) (n = 38)
Valor p	p < 0,005	p < 0,01	p < 0,01

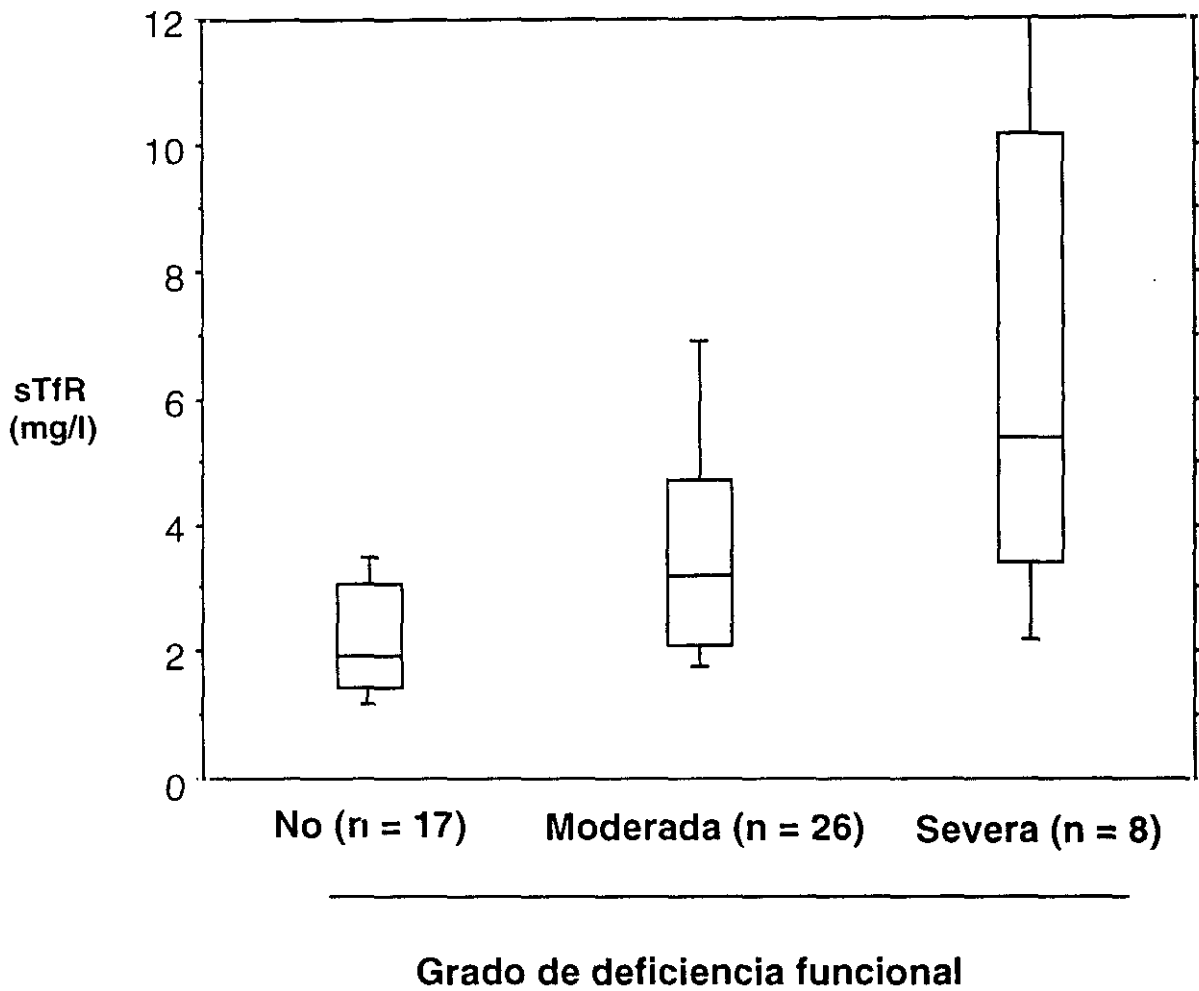
*Se han excluido los pacientes con alteraciones de la maduración de la serie roja, hipoplasia, o hiperplasia eritropoyética.

Figura 30. Influencia de la deficiencia funcional de hierro en los niveles del sTfR, en pacientes sin ferropenia.



Se han excluido los pacientes ferropénicos, y también los que tenían hipoplasia, o hiperplasia eritropoyética, o alteraciones en la maduración de la serie roja.

Figura 31. Influencia del grado de deficiencia funcional de hierro en los niveles de sTfR, en pacientes sin ferropenia.



ANOVA (p < 0,0001)

Se han excluido los pacientes ferropénicos, y aquellos con hipoplasia, o hiperplasia eritropoyética, o con alteraciones en la maduración de la serie roja.

-La deficiencia funcional no asociada a mala distribución de hierro:

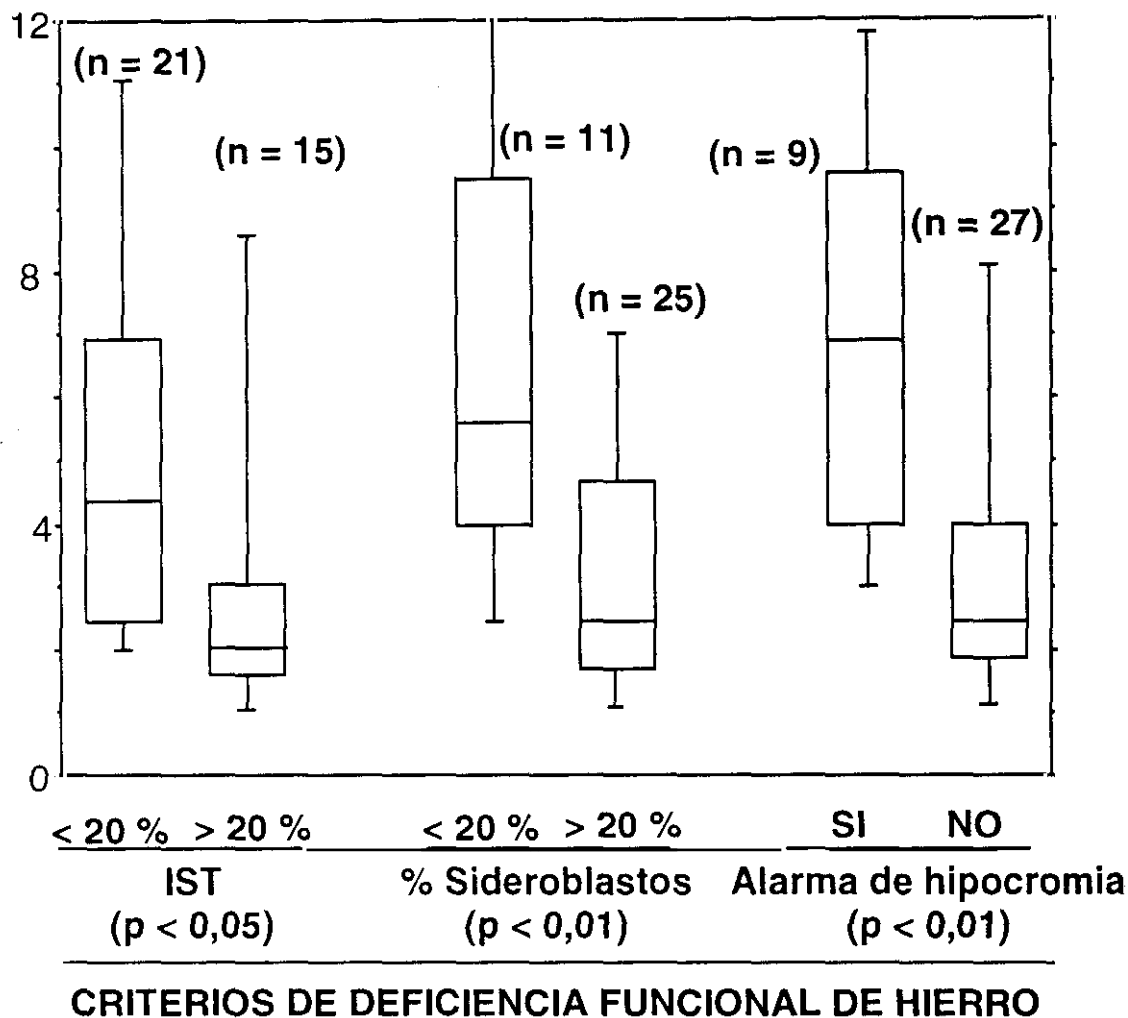
Excluyendo a los pacientes con patrón de boqueo y sobrecarga de hierro, se seguía observando que los niveles de sTfR eran significativamente mayores en los pacientes con deficiencia funcional por cualquiera de los tres criterios (tabla 36 y figura 32). El grado de deficiencia funcional también condicionaba significativa y escalonadamente los niveles de sTfR ($p < 0,01$). Los datos están ilustrados en la figura 33. Las medianas y rangos de sTfR en los grupos eran para los 13 pacientes sin deficiencia 2 mg/l (1 a 4,6 mg/l), para los 17 pacientes con deficiencia funcional moderada 4,9 mg/l (1 a 15,2 mg/l), y para los 6 pacientes con deficiencia funcional severa 5,7 mg/l (2,5 a 11,6 mg/l).

Tabla 36. Niveles de sTfR (mg/l) en pacientes sin alteraciones de distribución orgánica de hierro, con deficiencia o sin deficiencia funcional.

Status	sTfR (mg/l)		
	IST	Sid	AHH
D. Funcional	4,5 (1 – 15,2) (n = 21)	5,6 (12,5 – 15,2) (n = 11)	6,9 (2,5 – 11,6) (n = 9)
No D. Funcional	2,1 (1 – 9,6) (n = 15)	2,5 (1 – 10,9) (n = 25)	2,5 (1 – 15,2) (n = 27)
Valor p	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,05$

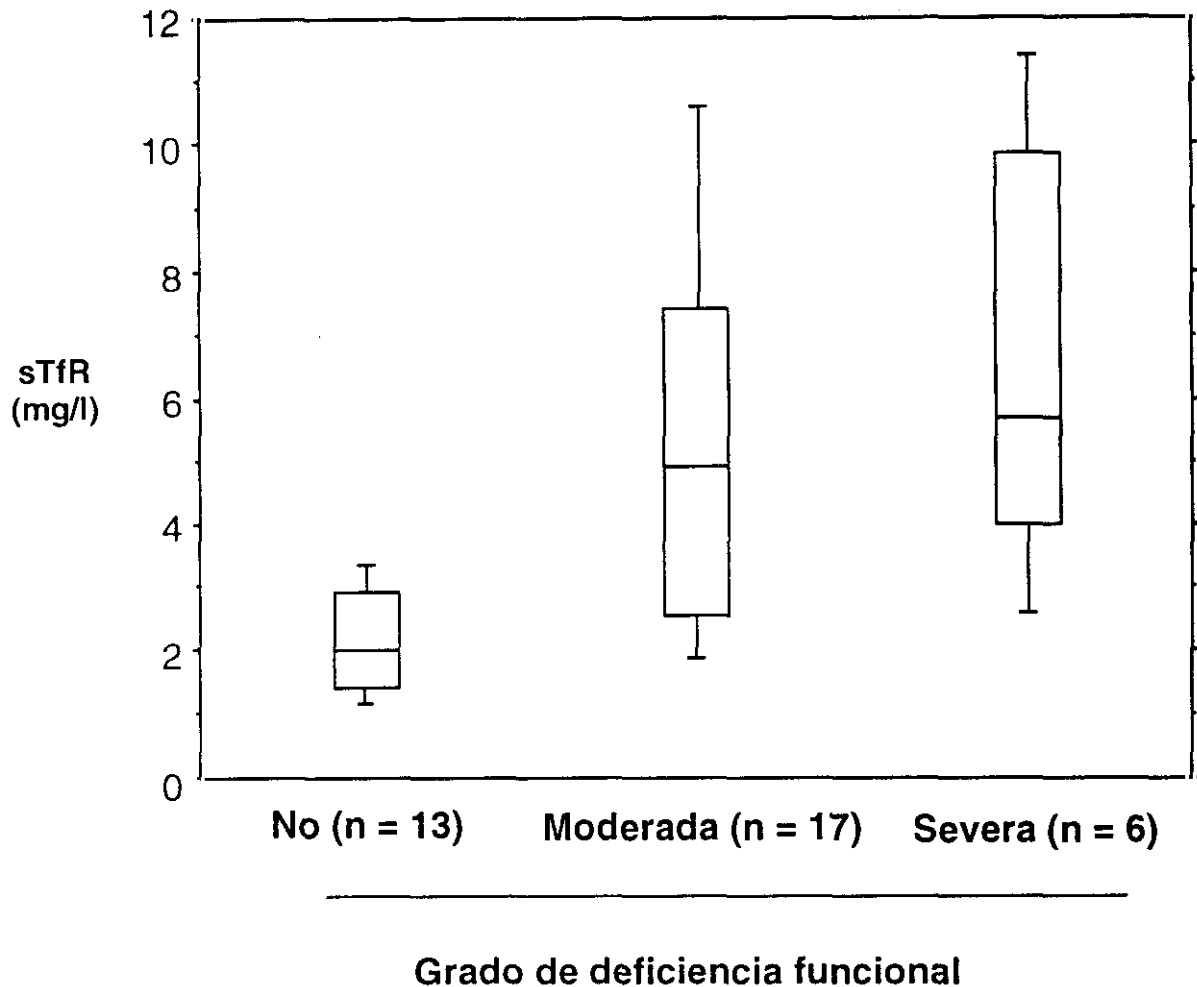
*Se han excluido los pacientes con alteraciones de la maduración de la serie roja, hipoplasia, o hiperplasia eritropoyética.

Figura 32. Influencia de la deficiencia funcional de hierro en los niveles de sTfR, en pacientes en los que no está bloqueado el metal en los macrófagos.



Se ha excluido los pacientes con patrón medular de bloqueo, y aquellos con hipoplasia, o hiperplasia eritropoyética, o con alteraciones en la maduración de la serie roja.

Figura 33. Influencia del grado de deficiencia funcional en los niveles de sTfR en pacientes en los que el hierro no está confinado en los macrófagos.



ANOVA ($p < 0,005$)

Se han excluido pacientes con patrón medular de bloqueo de hierro, y aquellos con hipoplasia, o hiperplasia eritropoyética, o con alteraciones en la maduración de la serie roja.

d) La inflamación.

Hemos comentado que en nuestro estudio observábamos que los pacientes con inflamación presentaban concentraciones de sTfR significativamente superiores a aquellos sin inflamación. También hemos expuesto que en nuestro estudio, la inflamación estaba significativamente asociada a dos situaciones que incrementan los niveles de sTfR, y que son la deficiencia funcional de hierro y la hiperplasia eritropoyética. Los modelos lineales generalizados determinaron que el factor inflamación no se asociaba por sí mismo a unos niveles superiores de sTfR, y que fueron las situaciones que se asociaban a él (deficiencia funcional de hierro e hiperplasia eritropoyética), las que elevaron los valores de este parámetro en los pacientes con inflamación. Para corroborar este extremo estudiamos la influencia de la inflamación en los niveles de sTfR en las siguientes situaciones:

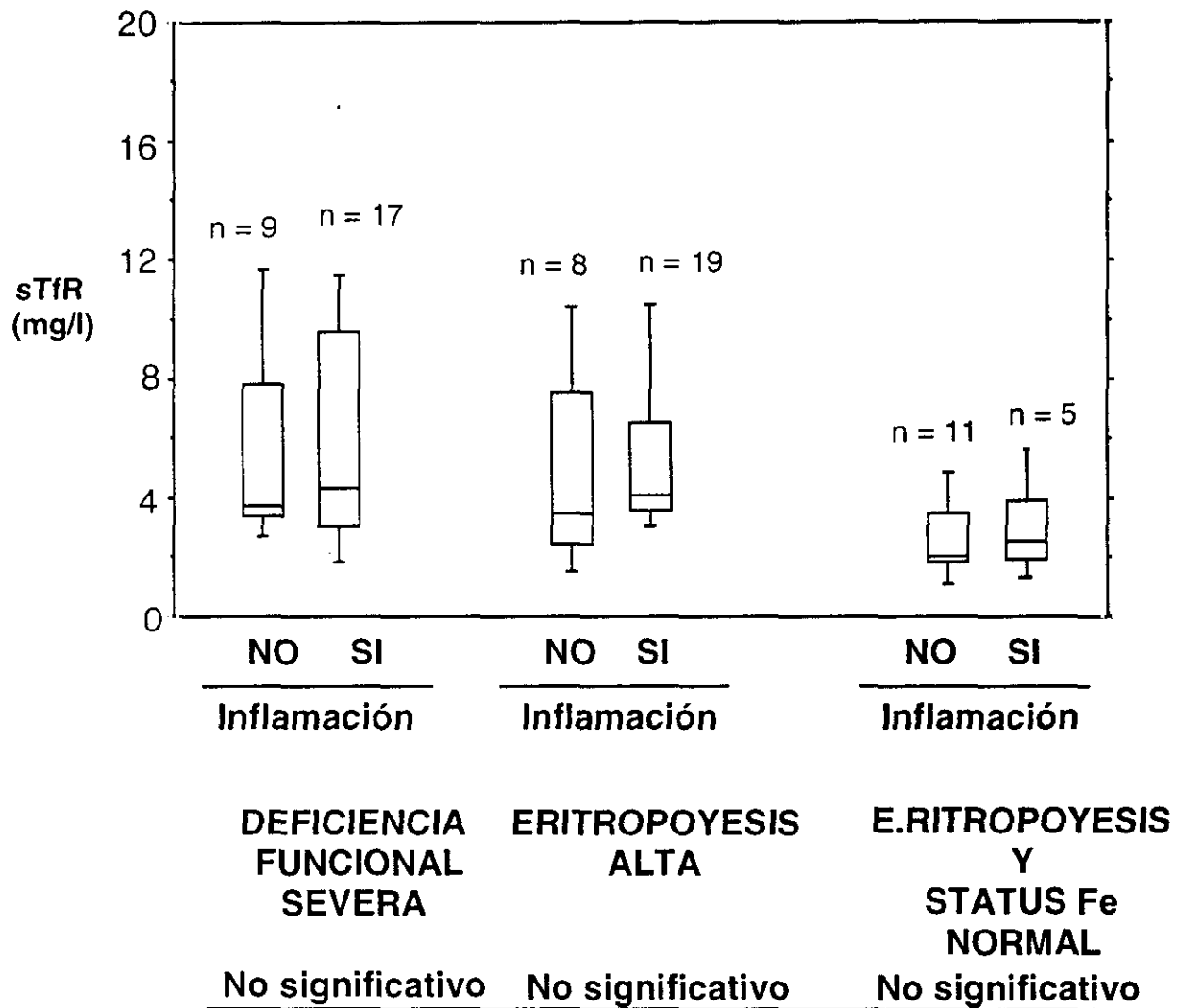
-Deficiencia funcional severa: Estudiando sólo aquellos pacientes que presentaban esta situación, los niveles de sTfR de los 17 pacientes con inflamación no eran significativamente diferentes a los 9 pacientes sin inflamación. Las medianas y rangos de los dos grupos fueron para el primer grupo 4,3 mg/l (1,7 a 16,8) mg/l, y para el segundo grupo 3,7 mg/l (2,5 a 11,6) mg/l.

-La hiperplasia eritropoyética: Si solo estudiábamos a los pacientes que presentaban esta situación, no se detectaban niveles de sTfR significativamente diferentes en los 19 pacientes que además presentaban inflamación (mediana de 4,1 mg/l y rango de 2 a 16,9 mg/l), que en los 8 pacientes que no tenían inflamación (mediana de 3,5 mg/l y rango de 1,2 a 11,5 mg/l).

-Eritropoyesis cuantitativamente normal y ausencia de deficiencia funcional: En esta otra situación, los niveles de sTfR de los 5 pacientes con inflamación, no eran significativamente diferentes a los 11 pacientes sin inflamación. Las medianas y rangos de sTfR de los distintos grupos fueron, en el primer caso 2,5 mg/l (1,3 a 5,4 mg/l), y en el segundo 2 mg/l (1 a 5,2 mg/l).

Este análisis queda detallado gráficamente en la figura 34.

Figura 34. Influencia de la inflamación en el comportamiento del receptor de la transferrina en suero.



Se han excluido pacientes con hipoplasia, o hiperplasia eritropoyética, y aquellos con alteraciones en la maduración de la serie roja.

5.2.2.3. El sTfR en pacientes que no presentan situaciones que aumenten disminuyan o alteren sus niveles:

La mediana y rango de sTfR en los 14 pacientes del estudio que tenían una actividad eritropoyética normal y sin alteraciones de maduración, y no padecían ningún grado de deficiencia funcional de hierro, ni tampoco sobrecarga del mismo, era 2,1 (1 a 4.6) mg/l. La media +/- desviación estándar era de 2,2=/ \pm 0,9 mg/l. En nuestro estudio detectábamos 42 pacientes con valores superiores al rango de referencia. De ellos, 17 tenían hiperplasia eritropoyética, 35 tenían deficiencia funcional de hierro moderada o severa, y sólo 3 no tenían ninguna de esas dos características. En esos tres casos los valores estaban cercanos a 4,6 mg/l (5,4, 5,2, y 5,1 mg/l).

6. DISCUSIÓN

Hemos evaluado el comportamiento del sTfR en las alteraciones del metabolismo del hierro, y su valor diagnóstico en un grupo de 172 pacientes atendidos en el Servicio de Hematología Analítica del Hospital La Paz, que se sometían a un estudio de médula ósea por diferentes motivos clínicos. En nuestro centro, la mayoría de los pacientes en los que se solicita este tipo de estudio, pertenecen a uno de los siguientes grupos:

- Pacientes con linfomas y tumores sólidos, con el fin evaluar la extensión del proceso maligno y la posibilidad de infiltración tumoral.
- Pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana, en los que se sospecha la existencia de un proceso infeccioso de localización medular (leismaniasis visceral, tuberculosis miliar) o un proceso linfomatoso.
- Pacientes en los que se sospecha una enfermedad hematológica maligna, un proceso tumoral con o sin afectación medular.
- Enfermos con fiebre de origen desconocido.

Este tipo de patologías se asocian a las diferentes alteraciones del metabolismo del hierro, y los parámetros del perfil férrico son difíciles de valorar (178, 179, 280). Además, son frecuentes las alteraciones cuantitativas y cualitativas del proceso hematopoyético en general, y del eritropoyético en particular.

El análisis microscópico de la actividad proliferativa medular, es una herramienta clínica utilizada habitualmente para evaluar la funcionalidad medular (260). La estimación del estado del hierro en el aspirado de médula ósea, constituye la técnica de referencia para establecer el estado de los depósitos de hierro y la disposición de los mismos (270). El hemograma y el perfil férrico forman parte de la analítica convencional complementaria, que se realiza en el laboratorio a este tipo de pacientes. La concentración de sTfR y de la proteína C reactiva, se determina con una alícuota de la muestra del perfil férrico.

6.1. Estudio inicial de las variables analizadas

6.1.1. COMPORTAMIENTO DE LOS PARÁMETROS DEL PERFIL FÉRRICO Y DEL HEMOGRAMA POR PATRONES DE DISPOSICIÓN DEL HIERRO, Y POR ESTADÍOS DE LA FERROPENIA.

a) Parámetros del hemograma:

En nuestro trabajo los pacientes se clasificaron en relación a su status férrico, en vez de ser agrupados en función de la presencia y tipo de anemia, y no excluimos a los pacientes sin anemia del estudio. Esto explica que no hayamos detectado diferencias significativas en las tasas de hemoglobina entre los pacientes con distintos patrones de disposición del hierro en médula ósea, ni en los distintos estadios de la ferropenia. Sin embargo el volumen corpuscular medio si se encontró disminuido en los pacientes con patrón de bloqueo de hierro y en los pacientes con ferropenia funcional, lo que probablemente reflejaba el desarrollo de una eritropoyesis deficiente en hierro (273).

b) Parámetros del perfil férrico:

Los pacientes con un patrón de distribución de hierro normal no presentaban alteraciones en la sideremia y el índice de saturación de la transferrina. Sin embargo su nivel de ferritina estaba por encima del rango de referencia, y su concentración de transferrina era inferior al mismo. La transferrina y la ferritina séricas se comportan como reactantes de fase aguda (36), lo que explica estos resultados.

La ausencia de hierro en depósito origina en suero, un aumento de las concentraciones de transferrina, y una disminución de las de ferritina (165), como sucedía en nuestro grupo de pacientes ferropénicos.

Coincidimos con estudios anteriores, en cuanto a la evolución de los marcadores del metabolismo del hierro, en los distintos estadios de la ferropenia (164): La disminución de la concentración de ferritina, y el aumento de la de transferrina acontece en la ferropenia, aunque esta todavía no tenga repercusión en el compartimento funcional. La sideremia y en el índice de saturación de la transferrina sólo descienden en el estadio de ferropenia funcional.

El perfil de datos que presentaron los pacientes con patrón de bloqueo, coincide con el que caracteriza habitualmente a los pacientes con anemia de los trastornos crónicos (122). La sideremia y el índice de saturación eran bajos, pero a diferencia de lo detectado en los pacientes ferropénicos, ni la transferrina era mayor ni la ferritina menor que la de los otros grupos de pacientes.

La concentración de hierro y el índice de saturación de la transferrina en suero, son marcadores utilizados en el laboratorio clínico, para la detección de la sobrecarga (145). Nuestros pacientes con patrón de sobrecarga, presentaban sideremias y índices de saturación de transferrina significativamente superiores al resto de los grupos. La ferritinemia no era significativamente mayor en este grupo. Este parámetro de sobrecarga es más tardío, menos sensible y menos específico que los dos anteriores (145). Además, en nuestro estudio, sus niveles se encontraban elevados en pacientes de todos los grupos, por los cuadros que presentaban, y el carácter de reactante de fase aguda de esta molécula (36).

6.1.2. UTILIDAD DEL PERFIL FÉRRICO PARA DETECTAR LA FERROPENIA.

Como ya hemos comentado transferrina y ferritina séricas se comportan como reactantes de fase aguda, pero de manera inversa: en la inflamación la primera disminuye, y la segunda aumenta (36). Este hecho condiciona su utilidad para diagnosticar la ferropenia, con la analítica rutinaria, en muchos enfermos.

La concentración de ferritina es el parámetro sérico que refleja mejor el estado de hierro en depósito, y el que se utiliza normalmente en el laboratorio clínico para detectar la ferropenia (173, 175). Pero nuestro estudio se realizó con enfermos en los que la ferritinemia era difícil de interpretar (178, 179), y por ello perdía sensibilidad. Utilizando el punto de corte de nuestro laboratorio, que es 20 ug/l, sólo se identificó 9 de los 45 pacientes ferropénicos del estudio, aunque sin falsos positivos. El aumento del punto de corte de la ferritina, que ha demostrado ser una medida útil en determinados grupos de pacientes (200, 201, 202, 275), en nuestro caso también mejoró la información proporcionada por este parámetro. A partir de la curva ROC, cambiamos dicho punto a 85 ug/l para este tipo de pacientes, medida que elevó la sensibilidad a un 56 %, manteniendo una especificidad aceptable

del 95 %. Este punto de corte concide con el que establecimos en un estudio anterior, con una muestra de pacientes similar (276).

El hallazgo de una concentración de transferrina sérica elevada sirve también habitualmente, de apoyo al diagnóstico de la ferropenia en la rutina clínica (164). Sin embargo en el caso de nuestros pacientes, y al igual que la ferritina, su valor y utilidad estaban condicionados por el comportamiento distorsionado que presenta, como reactante de fase aguda (36). En nuestro estudio el nivel de transferrina sérica era efectivamente mayor en los pacientes con ferropenia que en los otros grupos. Pero en valor absoluto, la concentración de transferrina fué inferior al rango de referencia en todos los grupos, excepto en los pacientes ferropénicos. En estos últimos la concentración coincidió con el rango de referencia, en lugar de ser superior como ocurre en la ferropenia, no complicada con procesos infecciosos ni crónicos asociados.

En un estudio previo, realizado en nuestro laboratorio, observabamos que en los pacientes en los que la ferritina era difícil de interpretar, la determinación conjunta de los niveles de transferrina sérica, mejoraba la capacidad de detectar la ferropenia (277). En este trabajo precisamos que, mientras que una concentración baja de transferrina no permite descartar la ferropenia, una concentración alta apoya al diagnóstico, incluso en casos en los que la concentración de ferritina no es baja. Si establecíamos en este tipo de pacientes, como criterio analítico de ferropenia, una concentración de ferritina inferior a 85 ug/l, o un nivel de transferrina superior a 350 mg/dl, aumentaba la sensibilidad a un 60 %, sin disminuir la especificidad.

6.1.3. ESTUDIO DE LA DEFICIENCIA FUNCIONAL DE HIERRO:

El índice de saturación de la transferrina, el porcentaje de sideroblastos, y la alarma de hipocromia, son marcadores que reflejan de manera diferente la deficiencia de hierro en el compartimento funcional (119, 270, 273). En nuestro estudio, la alarma de hematíes hipocrómicos se comportaba como el marcador mas específico. Esto se debe a que la aparición de glóbulos rojos hipocrómicos sólo ocurre tras un cierto periodo de eritropoyesis deficiente en hierro (273). El porcentaje de sideroblastos en médula informa de la cantidad de hierro del que disponen los eritroblastos, para la síntesis de hemoglobina. Es por tanto el parámetro que explora directamente el estado férrico en el compartimento funcional. Sin embargo su rendimiento analítico está

condicionado por la verdadera representatividad que tenga la muestra obtenida del tejido del que procede, y por la subjetividad e inexactitud a que esta sujeto todo conteo celular con microscopio (270, 271). Ello explica que de los tres parámetros sea el que, en nuestro estudio, presentaba peores características de sensibilidad y especificidad. La disminución del índice de saturación de la transferrina es el indicador más sensible de deficiencia funcional, lo que probablemente se debe a que se altera desde el mismo momento en que acontece la deficiencia (274). Su especificidad se ve comprometida por las fluctuaciones fisiológicas de la sideremia (182). No obstante entre los tres parámetros era el que presentaba mejor relación sensibilidad-especificidad.

Los tres parámetros son complementarios. Aunque su conducta no es superponible, la fuerte asociación que presentan avala su vinculación a la deficiencia funcional de hierro (278).

La deficiencia de hierro en el compartimento funcional no debe identificarse con ferropenia, puesto que no es una situación a la que se llegue exclusivamente tras el agotamiento de los depósitos orgánicos de hierro. También la presentan los pacientes con un patrón de bloqueo (122), como se constató en nuestro estudio. Además los pacientes con deficiencia funcional no se caracterizaban por tener niveles superiores de transferrina, e inferiores de ferritina, como caracteriza a la ferropenia.

La deficiencia funcional de hierro, si está íntimamente unida a la eritropoyesis deficiente en hierro (163, 165). De hecho los pacientes con deficiencia funcional presentaban una disminución de la hemoglobina, el volumen corpuscular medio, la concentración de hemoglobina corpuscular media, y los parámetros de dispersión corpuscular RDW y HDW.

6.1.4. EL GRADO DE HEMATOPOYESIS Y DE ERITROPOYESIS:

a) Concordancia de la estimación del estudio microscópico medular y los recuentos celulares:

La utilidad de la valoración microscópica de la actividad eritropoyética y hematopoyética medular en nuestro estudio, quedaba contrastada por la relación de los resultados con los recuentos celulares. El grado de hematopoyesis se relacionó con el conteo de leucocitos y plaquetas. El grado de actividad eritropoyética mantenía una estrecha relación con el conteo de reticulocitos.

b) Relación entre el grado de actividad eritropoyética y otros factores:

Los parámetros del perfil férrico no presentaron ninguna relación con la actividad eritropoyética. Pero en el hemograma, los valores más elevados de los parámetros de dispersión corpuscular, RDW y HDW, que se detectan en la hiperplasia eritropoyética, reflejan la salida prematura de reticulocitos inmaduros a sangre periférica, con un volumen mayor, lo que se traduce en una población más heterogénea de hematíes circulantes (163).

Puede existir cierta tendencia a que en la hiperplasia eritropoyética se desencadene una deficiencia funcional de hierro, como ocurre con la administración exógena de eritropoyetina (273, 279). Esta deficiencia tendría su origen en que la velocidad de consumo en la hiperplasia eritropoyética sea mayor que la velocidad con que se moviliza el hierro en los depósitos para atender la demanda. En nuestro estudio esta tendencia a la deficiencia funcional cuando la eritropoyesis está alta, fue moderada, y sólo alcanzó significación estadística con el criterio del índice de saturación de transferrina menor del 20 %. Los conteos reticulocitarios de los pacientes con deficiencia funcional, estaban solapados con los de los enfermos sin deficiencia.

6.1.5. LA EXISTENCIA DE ALTERACIONES DE MADURACIÓN EN LA ESTIRPE ERITROIDE:

Los pacientes con alteraciones de la maduración de nuestro estudio presentaban una serie de alteraciones analíticas, que están vinculadas con la eritropoyesis ineficaz y el aborto intramedular: Tasas de hemoglobina bajas, *parámetros de dispersión corpuscular* elevados, cifras de ferritina altas y tendencia a la hiperplasia eritropoyética pero sin elevación de los contajes reticulocitarios. Otros autores han comunicado resultados similares (36, 260).

6.1.6. LA RESPUESTA INFLAMATORIA:

A pesar de que la inflamación no se relacionó con la presencia o ausencia de hierro en depósito o con el estadio de la ferropenia, los niveles de ferritina y transferrina se modificaban esta situación. La ferritina sérica se elevó y la transferrina disminuía, lo que queda explicado por su condición de reactantes de fase aguda (11, 34, 36).

El proceso inflamatorio altera el manejo del hierro (121, 124, 125), y por eso se asoció en nuestros pacientes a patrones de bloqueo y sobrecarga. El secuestro de hierro en los macrófagos puede estar desencadenado por las citoquinas liberadas en el fenómeno inflamatorio (97, 133).

La relación que se detectó entre la inflamación y la deficiencia funcional de hierro, deriva de la relación entre la primera y el patrón de bloqueo (124, 125).

En nuestro estudio se observaba también una asociación entre el fenómeno inflamatorio y un grado de actividad eritropoyética anormal.

6.2. Relación entre las concentraciones séricas del sTfR y las variables estudiadas:

6.2.1. EL sTfR Y EL PATRÓN MEDULAR DEL HIERRO:

El valor diagnóstico del sTfR, para diferenciar la anemia ferropénica de la anemia de los trastornos crónicos, en situaciones que dificultan la interpretación de los parámetros del perfil férrico, y ha sido objeto de numerosos estudios, en los últimos años, con resultados controvertidos.

Nosotros hemos determinado que la concentración del sTfR no permite diferenciar los pacientes con y sin ferropenia. Tampoco permite distinguir, entre los pacientes con anemia, aquellos con deficiencia de hierro en el compartimento de depósito. A diferencia de los defendido por otros autores, tampoco que el ratio sTfR/log de ferritina sérica mejoró la rentabilidad analítica de ambas determinaciones por separado (281, 282). Consideramos que la manera mas racional de diagnosticar con certeza la ferropenia es analizar el compartimento de depósito directamente, o con marcadores del mismo. El estudio medular sigue siendo la técnica de referencia, para diagnosticar la ausencia de hierro en el compartimento de depósito. Además hemos demostrado que la determinación de ferritina sérica es un parámetro mejor que el sTfR para detectar la ferropenia, y en este extremo coincidimos con otros autores (283, 284). Encontramos útil subir el punto de corte de la ferritina sérica, en determinados tipos de pacientes, y también combinar la determinación de ferritina sérica con la determinación de transferrina, como se ha propuesto en otros trabajos (200, 201, 202, 276). La fiabilidad analítica obtenida, es superior a la de otros parámetros del compartimento funcional, como la protoporfirina intraeritrocitaria, la ferritina intraeritrocitaria o el mismo sTfR.

Como en otros trabajos, hemos observado que la tendencia del sTfR es aumentar sus valores no sólo en la ferropenia, sino también en el bloqueo, y por analogía en la anemia de los trastornos crónicos (247, 284, 285, 286), y disminuir en la sobrecarga (285). El gran solapamiento entre los valores de sTfR en los distintos patrones de disposición del hierro en médula ósea, ya informado por otros autores (247, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289), hace imposible el emplear la determinación del sTfR de forma aislada para establecer el status férrico del paciente.

Aunque en el diagnóstico del status férrico de un paciente, el valor del sTfR de forma aislada no es concluyente, no rechazamos su posible utilidad en el seguimiento individual del paciente que sufre un desbalance del hierro, como se propone en algunos trabajos (251, 254).

6.2.2. EL sTfR Y LA DEFICIENCIA FUNCIONAL DE HIERRO:

El sTfR está elevado en la deficiencia funcional y en proporción al grado de la misma. Si en el estudio de Skikne y cols (251) se evidenciaba este hecho mediante el seguimiento de la evolución de una deficiencia funcional progresiva en los mismos individuos, en nuestro estudio se demuestra este extremo, estudiando el sTfR en tres grados de deficiencia funcional, en distintos pacientes, en función de la alteración o no de tres marcadores diferentes.

6.2.3. EL sTfR Y EL ESTADIO DE LA FERROPENIA:

El estadio de ferropenia latente no se caracterizaba, en nuestro trabajo, por un aumento de los niveles de sTfR, aumento que si se producía cuando la deficiencia tenía repercusión en el compartimento funcional, es decir en el estadio de ferropenia funcional.

Este hecho, junto a la fuerte relación que se establece entre el aumento de los niveles de sTfR y el grado de deficiencia funcional, tienen su explicación en que este parámetro es en realidad un marcador del compartimento funcional central, y no del compartimento de depósito. Sus valores aumentan en relación a la deficiencia existente en las células funcionales. No corroboramos lo que han propuesto algunos trabajos, en lo que respecta a que el sTfR aumentaba específicamente como consecuencia del agotamiento de hierro en depósito, y que por lo tanto podría ser utilizado como marcador de ferropenia (249, 281, 282, 290).

6.2.4. EL sTfR Y EL GRADO DE ACTIVIDAD ERITROPOYÉTICA:

La relación entre el grado de actividad eritropoyética y los niveles de sTfR ha sido establecida en numerosos trabajos (212, 218, 253). Nosotros también hemos observado la estrecha influencia que ejerce el grado de actividad eritropoyética sobre los niveles de sTfR.

6.2.5. EL sTfR Y LA CALIDAD DE LA MADURACIÓN DE LA SERIE ROJA:

Los pacientes con alteraciones de la maduración de la serie roja, no se caracterizaron por niveles de sTfR significativamente diferentes de aquellos que no tienen este tipo de disfunción. Sin embargo esta alteración se asocia a la hiperplasia eritropoyética.

6.2.6. EL sTfR Y LA INFLAMACIÓN:

Nuestros pacientes con inflamación presentaban niveles significativamente superiores de sTfR al resto de los pacientes, lo que puede hacer pensar en un principio que es un reactante de fase aguda. Pero también habíamos detectado en nuestro estudio una asociación entre la inflamación y la deficiencia funcional de hierro, y entre la inflamación y la hiperplasia eritropoyética, factores estos que elevan los niveles del sTfR.

6.3. Significado de las variaciones en la concentración sérica de sTfR

El estudio de los modelos lineales generalizados ha puesto de manifiesto que los niveles séricos de sTfR dependen fundamentalmente del grado de actividad eritropoyética y del grado de deficiencia funcional de hierro en una magnitud similar, y, en menor medida, de la existencia de alteraciones de maduración en el proceso eritropoyético. Asimismo se establece que no tienen influencia por sí mismas el patrón de disposición y la inflamación.

6.3.1 EL GRADO DE ERITROPOYESIS Y EL GRADO DE DEFICIENCIA FUNCIONAL:

La influencia de ambos factores sobre los niveles de sTfR ya ha sido establecida en varios trabajos (212, 218, 253, 251, 254), pero siempre se han estudiado por separado. En nuestro estudio hemos demostrado que la combinación de ambos factores es la que determina fundamentalmente el nivel de sTfR. Una misma concentración de sTfR puede reflejar diferentes grados de deficiencia funcional de hierro, dependiendo del grado de eritropoyesis del paciente. Y a su vez una misma concentración de sTfR puede reflejar diferentes grados de actividad eritropoyética en función de la severidad de la deficiencia funcional de hierro.

Entendemos prudente que cuando se estudie el sTfR como marcador de uno de los dos factores, se obtenga información adicional sobre el otro (determinación del conteo de reticulocitos, o del índice de saturación de la transferrina según el caso), para interpretar correctamente los resultados.

6.3.2. EL PATRÓN MEDULAR DE HIERRO:

El patrón medular de hierro no condiciona directamente el valor de sTfR. La situación de ferropenia tampoco. Los niveles elevados que se detectan en los pacientes con patrón de ferropenia o de bloqueo de hierro, en nuestro trabajo y en los publicados por otros autores (247, 283, 284, 286, 287, 288, 289), reflejan en realidad la deficiencia de hierro en el compartimento funcional.

Y en el caso de la ferropenia, el aumento sólo se produce en el estadio de ferropenia funcional, cuando el compartimento del mismo nombre es el que se encuentra afectado.

En el caso del patrón de bloqueo, y de la anemia de los trastornos crónicos, el aumento de sTfR es más moderado que el de la ferropenia, debido seguramente a la hipoplasia eritropoyética medular que lleva implícita este tipo de trastornos (122).

Nuestros resultados no están en contradicción con los estudios que detectan en la anemia ferropénica una elevación del sTfR, con respecto a los rangos de referencia de individuos sanos (218, 253), puesto que este tipo de anemia lleva asociada una deficiencia funcional, alteración que no se da en un

individuo sano. De hecho, cuando establecíamos un grupo control de pacientes sin anemia ni ferropenia, y sin situaciones eritropoyéticas anormales y que alteraran la conducta del sTfR, y comparábamos sus niveles de sTfR con nuestros pacientes con anemia ferropénica, estos últimos presentaban también niveles significativamente superiores de sTfR a los del grupo control. Pero en nuestro estudio, esta diferencia de valores de sTfR se ciñe únicamente a dos grupos específicos, y es un error generalizar, deduciendo de ello, que en un paciente con anemia, el sTfR permite detectar la falta de hierro en depósito, como han propuesto algunos autores.

En cuanto a la sobrecarga de hierro, nuestros datos son limitados. La sobrecarga orgánica de hierro no se detecta claramente con un estudio microscópico medular (271), y además el grupo lo constituye un bajo número de pacientes. Sin embargo, nuestros resultados son compatibles con la teoría de otros autores que describen una disminución del nivel de sTfR en la sobrecarga (285). Consideramos que los hallazgos realizados hasta ahora en el tema, invitan a realizar estudios más específicos, que aclaren la verdadera utilidad de la determinación de sTfR en la detección de estados de sobrecarga de hierro, y en la detección precoz de los homocigotos de hemocromatosis hereditaria. Por otra parte, durante el tratamiento de las hemocromatosis, se pasa bruscamente de un status de exceso de hierro, a otro de deficiencia. Ambas situaciones podrían controlarse con la determinación del sTfR. Por ello pensamos que debería ser evaluada de manera específica, la utilidad de determinar el sTfR, en el seguimiento de los pacientes con hemocromatosis, y en la monitorización del tratamiento (291).

6.3.3. EL sTfR Y LA DEFICIENCIA FUNCIONAL DE HIERRO NO PRODUCIDA POR FERROPENIA:

El aumento del sTfR en la deficiencia funcional producida por una disminución del hierro orgánico total con agotamiento de los depósitos de hierro ya había sido establecido en el trabajo de Skikne (251). Este se desarrolló en individuos sanos, en los que la única causa posible de deficiencia funcional de hierro, era la disminución del hierro orgánico total. Sin embargo los procesos inflamatorios, infecciosos, y crónicos, llevan asociados en muchas ocasiones una deficiencia funcional de hierro que no se acompaña de una disminución del hierro orgánico total, ni de un agotamiento de las reservas, sino que se origina por un confinamiento del

hierro en los macrófagos (124, 125). Esta deficiencia funcional, ligada a la fisiopatología de la anemia de los trastornos crónicos, genera, al igual que la ferropenia funcional, una eritropoyesis deficiente en hierro, en la que se detecta hipocromia y microcitosis en los eritrocitos jóvenes (122), acompañadas de un aumento de la protoporfirina intraeritrocitaria (188), y de una disminución de la ferritina intraeritrocitaria.

El presente trabajo demuestra por primera vez, que el sTfR aumenta también en esta deficiencia funcional de hierro que no asociada al agotamiento de los depósitos. Y este hecho tiene su explicación en que el aumento del sTfR refleja en realidad el mecanismo de defensa del eritroblasto ante la deficiencia (cualquiera que sea su origen), que no es otro que el de aumentar la expresión del receptor para captar más hierro del exterior.

En la última década, se han publicado varios estudios en los que se ha comprobado la utilidad de tratar la deficiencia funcional de hierro, causada por confinamiento del metal en los macrófagos, utilizando agentes quelantes del hierro. Estos fármacos pueden mejorar la disfunción, y parecen favorecer el acceso del hierro al eritroblasto, actuando a varios niveles:

- Ejerciendo como transportadores, de una forma similar a la transferrina (292).
- Difundiendo a través de la membrana del eritroblasto, y facilitando el paso del hierro al interior del mismo (293).
- Donando hierro a la transferrina, especialmente en situaciones en que el índice de saturación de esta es bajo (292).
- Aumentando la expresión del receptor de la transferrina (294).

La administración conjunta de eritropoyetina y quelantes de hierro parece tener una acción aún más potente (295).

A la vista de estos estudios, consideramos prometedora la posibilidad de detectar e identificar este tipo de deficiencia funcional de hierro no ferropénica, con la determinación del parámetro que hemos evaluado (sTfR), sólo, ó en asociación con otros marcadores del metabolismo del hierro. Sería útil poder detectar qué pacientes con ATC presentan esta disfunción, y podrían mejorar su metabolismo férrico con el tratamiento con quelantes.

6.3.4. EL sTfR Y LAS ALTERACIONES DE LA MADURACIÓN:

En el estudio inicial detectábamos como las alteraciones de la maduración se asociaban a hiperplasia eritropoyética, pero no se caracterizaban por niveles superiores de sTfR. Los modelos lineales generalizados ponen de manifiesto que, efectivamente las alteraciones de la maduración tienen influencia en la conducta del sTfR, y ocasionan una distorsión de la misma:

-El sTfR aumenta en menor medida en respuesta a la deficiencia funcional de hierro y a la hiperplasia eritropoyética, en los pacientes con alteraciones de la maduración, que en los pacientes que no presentan estos rasgos diseritropoyéticos.

-Cuando la eritropoyesis es normal y no hay deficiencia funcional de hierro, el sTfR esta casi significativamente mas elevado en pacientes con alteraciones de maduración, que en aquellos que presentan una maduración cualitativamente correcta.

Si en un trabajo precedente se observó esta alteración del comportamiento del sTfR, como marcador de la eritropoyesis, en pacientes con anemia megaloblástica (241), nosotros generalizamos esta consideración. Los niveles de sTfR se distorsionan en los procesos diseritropoyéticos, y alteran, tanto los niveles basales, como la relación entre el marcador, la eritropoyesis, y la deficiencia funcional de hierro.

Esta distorsión en la conducta del sTfR puede tener varias explicaciones. Durante el proceso de maduración de la serie roja en médula, la cantidad de receptores de transferrina de la membrana celular varía drásticamente en los distintos estadios (46). Alteraciones patológicas en la maduración que modifiquen el porcentaje de células de cada estadio, como las paradas madurativas, pueden modificar la masa absoluta de receptores en la médula. El sTfR debe sus concentraciones plasmáticas precisamente, al receptor que presentan en sus membranas las células de la serie roja de la médula ósea (218), y por lo tanto se puede ver afectado por estas disfunciones. Por otro lado las disfunciones de estas células progenitoras, podrían alterar la expresión del receptor en sus membranas. Y finalmente, en las diseritropoyesis, las concentraciones de sTfR en suero, pueden perder su relación directa con la cantidad de receptor presente en la membrana de las células de estirpe eritroide (288).

6.3.5. EL sTfR Y LA INFLAMACIÓN:

Los pacientes con inflamación presentan niveles elevados de sTfR. Pero ello no se debe a que este parámetro se comporte como un reactante de fase aguda, como ha quedado demostrado en los modelos lineales generalizados, sino a que la inflamación se asocia con dos situaciones que sí producen un aumento de los niveles de sTfR, que son la deficiencia funcional de hierro y la hiperplasia eritropoyética. Consideramos que el sTfR, a diferencia de las concentraciones de transferrina y ferritina séricas, no se comporta como un reactante de fase aguda (165, 249), y que el aumento que se observa en algunos grupos de pacientes con procesos inflamatorios, se debe en realidad a factores como la deficiencia funcional de hierro, o la hiperplasia eritropoyética, asociados a la inflamación, y que no fueron analizados en los estudios.

6.3.6. RANGOS DE REFERENCIA PARA EL sTfR:

En nuestro estudio solo había 14 pacientes que no presentaban situaciones de deficiencia funcional de hierro o sobrecarga, o eritropoyesis anormales tanto cuantitativamente como cualitativamente, en las que los niveles de sTfR tienden a aumentar, disminuir, o distorsionarse. La coincidencia de los valores de sTfR en estos 14 pacientes (en los que la mediana fue 2,1 mg/l, el rango de 1 a 4,6 mg/l, la media 2,2 mg/l, y la desviación estándar 0,9 mg/l), con los de los rangos de referencia establecidos en individuos sanos en otros estudios (234, 282), apoya la teoría de que los factores mencionados, son los que condicionan los niveles del marcador. Creemos adecuado poner el límite superior del rango de referencia en 4,6 mg/l.

7. CONCLUSIONES

1-Los factores que influyen decisivamente en las concentraciones séricas de sTfR son el contenido de hierro que tienen las células de compartimento funcional, y el grado de actividad y la calidad de la eritropoyesis.

2-El sTfR es un indicador del hierro que contienen las células del compartimento funcional. Sus niveles aumentan en relación a la magnitud de la deficiencia, y reflejan el incremento de la expresión del receptor de la transferrina en el eritroblasto para hacer frente a dicha deficiencia.

3-La relación entre los niveles de sTfR y la deficiencia funcional de hierro se observa independientemente de que su causa sea la ferropenia, o el bloqueo de hierro en los macrófagos.

4-El grado de actividad eritropoyética ejerce una influencia sobre la concentración sérica del sTfR, de forma similar a la deficiencia funcional. En la hiperplasia eritropoyética se elevan los niveles del sTfR en suero, mientras que en la hipoplasia disminuyen.

5-Las alteraciones en el proceso de maduración de la serie roja producen una distorsión en la concentración sérica del sTfR. Sus niveles basales son mayores, y, tanto en la hiperplasia eritropoyética como en la deficiencia funcional de hierro, se produce una elevación en los niveles del parámetro, inferior a la esperada.

6-El sTfR no se comporta como un reactante de fase aguda, y su concentración sérica no se modifica por la respuesta inflamatoria.

7-El sTfR puede ser utilizado como marcador de la eritropoyesis, y de la deficiencia funcional de hierro. Pero consideramos que es la combinación del grado de actividad eritropoyética y el grado de deficiencia funcional, el que determina en gran medida los niveles de sTfR. Por ello proponemos que, cuando se emplee este parámetro como marcador férrico, se tenga en cuenta el estado de la eritropoyesis, y si se su utiliza como marcador de eritropoyesis, se considere también el estado del metabolismo del hierro.

8-El sTfR no es un parámetro específico para detectar la ferropenia, porque no es un marcador del compartimento de depósito. Para este fin proponemos aplicar la determinación clásica de la ferritina, el cambio de su punto de corte en determinados grupos de pacientes, y su evaluación conjunta con la transferrina sérica.

8. RESUMEN

Los marcadores bioquímicos utilizados actualmente en el laboratorio clínico para la evaluación del metabolismo del hierro, no permiten detectar en muchos casos la ausencia de hierro en depósito, ni el grado de deficiencia funcional o de sobrecarga del metal. El receptor soluble de la transferrina (sTfR), procede del receptor de la transferrina de la membrana celular. La utilidad clínica de la determinación de este nuevo marcador, todavía no está bien aclarada.

OBJETIVOS:

El objetivo de este trabajo es analizar la relación entre la concentración sérica de sTfR, y el metabolismo férrico en condiciones patológicas.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Hemos estudiado la concentración de sTfR en una serie de 172 pacientes con diversas enfermedades hematológicas, procesos tumorales, infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana, o pendientes de diagnosticar, y en los que era imprescindible el estudio de la médula ósea, para descartar infiltración tumoral o granulomatosa. Entre ellos había 95 enfermos con anemia, y 77 sin anemia. Tanto el grado y calidad de la actividad eritropoyética, como el estado de los depósitos de hierro de los pacientes, se establecieron en base al estudio microscópico medular. La deficiencia funcional de hierro y su intensidad, fueron delimitados teniendo en cuenta el índice de saturación de la transferrina, el porcentaje de sideroblastos en médula, y la alarma de hematíes hipocrómicos del hemograma.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES:

La concentración sérica de sTfR aumenta en situaciones de deficiencia funcional de hierro, tanto en la ferropenia, como en el bloqueo del metal en los macrófagos. Los niveles del marcador se elevan más en los pacientes en los que la deficiencia alcanza mayor intensidad. Los pacientes sin deficiencia funcional de hierro tenían una mediana de sTfR de 2,1 mg/l, aquellos con deficiencia funcional moderada presentaban una mediana de 3,5 mg/l, y aquellos con deficiencia funcional severa, una mediana de 4,3 mg/l ($p < 0,0001$).

Los niveles del marcador también reflejan el grado de actividad eritropoyética medular. Los pacientes con hipoplasia eritropoyética presentaban una mediana de sTfR de 2,2 mg/l, los que tenían una actividad eritropoyética cuantitativamente normal, una mediana de 3 mg/l, y aquellos que tenían hiperplasia eritropoyética, una mediana de 4,2 mg/l.

En pacientes que presentan alteraciones en la maduración de la serie roja, el comportamiento de sTfR se modifica ($p < 0,05$). El parámetro se eleva en menor medida en respuesta a la hiperplasia eritropoyética (mediana de 3,6 mg/l), que en los pacientes sin esta disfunción (mediana de 5,5 mg/l y $p < 0,05$). El incremento de los niveles de sTfR en la deficiencia funcional de hierro, también parecía menor en este tipo de pacientes, aunque la diferencia detectada no alcanzaba significación estadística ($p < 0,1$).

Las concentraciones de sTfR de los 14 pacientes que no tenían deficiencia funcional de hierro, y cuya actividad eritropoyética era cuantitativamente y cualitativamente normal, se encontraban dentro del rango de referencia establecido por otros autores.

El sTfR no se comporta como un reactante de fase aguda. En el estudio de los modelos lineales generalizados, quedó constancia de que su elevación en los procesos inflamatorios, va ligada a la deficiencia funcional a que se asocian los mismos, y no a la inflamación.

Este parámetro no es sensible ni específico para detectar la ferropenia, porque no es un marcador de depósito orgánico de hierro. La ferritina sérica presenta un rendimiento analítico muy superior para este objetivo.

El nuevo marcador puede ser utilizado como indicador del grado de deficiencia funcional de hierro, y también del grado de eritropoyesis. Pero si se utiliza como índice de deficiencia, se necesita conocer el grado de actividad eritropoyética del paciente. Su aplicación en la evaluación del grado de eritropoyesis, requiere tener también en cuenta el status férrico del paciente.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Doadrio A. Características químicas y funciones biológicas de los elementos de transición esenciales. Hierro. En Química Bioinorgánica. Ediciones LAEF 1979. Universidad Complutense de Madrid. pp VII.1-47
2. Lehninger A.L. Bioquímica: Las bases moleculares de la estructura y función celular. Segunda edición. Ediciones Omega. Barcelona. 1989.
3. Lash A., Saleem A. Iron Metabolism and Its Regulation. A Review. *Ann Clin Lab Sci*. 1995; 25:20-30.
4. Bothwell T.H., Charlton R.W., Cook J.D., Finch C.A. Iron metabolism in man. Oxford: Blackwell 1979.
5. Uchida. T. Overview on iron metabolism. *Int J Hematol*. 1995; 62; 193-202.
6. Aisen P. Current concepts in iron metabolism. *Clin Hematol*. 1982; 241-57.
7. Crichton R.R., Ward R.J. Iron Metabolism: New Perspectives in View. *Biochem*. 1992;11255-64.
8. Finch C.A., Huebers H. Perspectives in iron metabolism. *N Engl J Med* 1982; 306:1520-28.
9. Woods s., De Marco T., Friedland M. Iron metabolism. *Am J Gastroenterol*. 1990; 85:1-8.
10. Finch C.A., Deubelbeiss K., Cook J.D. y cols. Ferrokintetics in man. *Medicine (Baltimore)* 1970; 49:17-53.
11. Van Eijk H.G., De Jong G. The Physiology of iron, transferrin, and ferritin. *Biol Trace Elem Res*; 1992; 35:13-24.
12. Bothwell T.H., Charlton R.W. Iron deficiency in women: report for the International Nutritional Anemia Consultative Group. 1981:1-68. 343. 113. 409.
13. Charlton R.W., Bothwell T.H. Iron absorption. *Annu Rev Med*. 1983; 34:55-68.
14. Cook J.D., Finch C.A. Iron nutrition. *West J Med*. 1975; 122:474-81.
15. Newman M.I. Nutritional adaptation in man. En: Bamon A., ed. *Physiological anthropology*. New York: Oxford University Press. 1975 408.
16. Dallman P.R., Siimes M.A., Stekel A. Iron deficiency in infancy and childhood. *Am J Clin Nutr*. 1980; 33:86-118.
17. Conrad M.E., Benjamin B.L., Williams H.L., Foy A.L. Human absorption of hemoglobin iron. *Gastroenterology*. 1967; 53:5-10.
17. Haymes EM. Nutritional concerns: Need for iron. *Med Sci Sports Exercise*. 1987; 19:197-200.

18. Brise H., Hallberg L. Absorbability of different iron compounds. *Acta Med Scand (Suppl)*. 1962; 376:23.
19. Conrad M.E., Umbreit J.N. A concise review: iron absorption-the mucin-mobilferrin-integrin pathway. A competitive pathway for metal absorption. *Am Hematol*. 1993; 42:67-73.
20. Conrad M.E., Umbreit J.N., Peterson F.D.A., Moore E.G., Harper K.P. Function of integrin in duodenal mucosal uptake of iron. *Blood*. 1993; 81:517-21.
21. Sheehan R.G. Unidirectional uptake of iron across intestinal brush border. *Am J Physiol*. 1976; 231:1438-44.
22. Teichmann R., Stremmel W. Iron uptake by human upper small intestine microvillous membrane vesicles: indication for a facilitated transport mechanism mediated by a membrane iron binding protein. *J Clin Invest*. 1990; 86:2145-53.
23. Young S., Bomford A. Transferrin and cellular iron exchange. *Clin Sci*. 1984; 67:273-8.
24. Bacon B.R., Tavill A.S. Role of the liver in normal iron metabolism. *Semin Liver Dis*. 1984; 4:180-92.
25. Worwood M. Serum ferritin. *Clin Sci*. 1986; 70:215-20.
26. Worwood M., Jacobs A. The subcellular distribution of ⁵⁹Fe in small intestinal mucosa: studies with normal, iron deficient and iron overloaded rats. *Br J Haematol*. 1972; 22:265-72.
27. Idzerda RL, Huebers H, Finch CA, McKnight GS. Rat transferrin gene expression: tissue specific regulation by iron deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83:3723-27.
28. Pietrangelo A., Rocchi E., Casalgrandi C., y cols. Regulation of transferrin receptor and ferritin genes in human duodenum. *Gastroenterology*. 1992;1 02:802-9.
29. Adams P.C., Zhong R., Haist J., Flanagan P.R., Grant D.R. Mucosal iron in the control of iron absorption in a rat intestinal transplant model. *Gastroenterology*. 1991; 100:370-4.
30. Pirzio-Beroli G., Finch C.A., Loden B. Iron absorption III. The influence of iron stores on iron absorption in the normal subject. *J Lab Clin Med*. 1960; 55:216-20.
31. Pootrakul P., Kitcharoen K., Yensukon P., y cols. The effect of erythroid hyperplasia on iron balance. *Blood*. 1988; 71:1124-29.
32. Finch C.A., Huebers H., Eng M., .Miller L. Effect of transfused reticulocytes on iron exchange. *Blood*. 1982; 59:364-9.

33. Hailberg L. Bioavailability of dietary iron in man. *Annu Rev Nutr.* 1981; 1:123-47
34. Brock J.H. Iron-binding Proteins. *Acta Paediatr Scan.* 1989: Suppl 361:31-43.
35. Tuil D., Vaulont S., Levin M.J., Munnich A., Moguilewsky M., Bouton M.M., Brissot P., Dreyfus J.C. , Kahn A. Transient transcriptional inhibition of the transferrin gene by cyclic AMP. *FEBS Lett.* 1985; 189: 310-04.
36. Fairbanks V.K., Klee G. Biochemical aspects of hematology. En: Burtis C.A., Ashwood E.R. (eds). *Tietz text book of clinical chemistry.* 2nd Edition. Philadelphia. PA. Saunders. 1994. pp 2063.
37. Yang F., Lum J.B., .McGill S.J.R., Moore C.M., Naylor S.L., VanBragt P.H., Baldwin W.D., Bowman B.H. Human transferrin: cDNA characterization and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984; 81:2752-6.
38. Aisen P., Leibman A., Zweier J. Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J Biol Chem.* 1978; 253:1930-7.
39. MacGillivray R.T., Mendez E., Shewale I.G., Sinha S.K., Lineback-Zins J., Brew K. The primary structure of human serum transferrin. The structure of seven cyanogen bromide fragments and the assembly of the complete structure. *J Biol Chem.* 1983; 258:3543-53.
40. Gordeuk V.R., Bacon B.R. Iron overload: Causes and consequences. *Annu Rev Nutr.* 1987; 7:485-508.
41. Huebers H.A., Finch C.A. The physiology of transferrin and transferrin receptors.
42. Trowbridge I.S., Newman R.A., Domingo D.L., Sauvage C. Transferrin receptors: structure and function. *Biochem Pharmacol.* 1984; 33:925-32.
43. Ward J.H. The structure, function, and regulation of transferrin receptors. *Invest Radiol.* 1987; 22:74-83.
44. Seligman P.A. Structure and function of the transferrin receptor. *Prog Hematol.* 1983; 13:131.
45. Intragumtornchai T., Huebers H.A., Eng M., Finch C.A. In vivo transferrin-iron receptor relationships in erythron of rats. *Am J Physiol.* 1988; 255:R326-31.
46. Iacopetta B.J., Morgan E.H., Yeoh G.C.T. Transferrin receptors and iron uptake during erythroid cell development. *Biochim Biophys Acta.* 1982; 687:204-10.
47. Vogel W., Bomford A., Young S., Williams R. Heterogeneous distribution of transferrin receptors on parenchymal and non parenchymal

liver cells: biochemical and morphological evidence. *Blood*. 1987; 69:264-70.

48. Sciot R., Paterson A.C., Van Den Oord J.J., Desmet V.J. Lack of hepatic transferrin receptor expression in hemochromatosis. *Hepatology*. 1987; 7:831-7.

49. Van Dijk J.P. Regulatory aspects of placental iron transfer. A comparative study. *Placenta*. 1988; 9:215-26.

50. Newman R.A. Lymphoid receptors for transferrin. *Methods Enzymol*. 1987; 150:723-45.

51. Esserman L., Takahashi S., Rojas V., Warnke R., Levy R. An epitope of the transferrin receptor is exposed on the cell surface of high-grade but not low-grade human lymphomas. *Blood* 1989; 74:2718-29.

52. Sciot R., Paterson A.C., van Eyken P., Callea F., Kew M.C., Desmet V.J. Transferrin receptor expression in human hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study of 31 cases. *Histopathology*. 1988; 12:53-63.

53. Trowbridge I.S. Transferrin receptor as a potential therapeutic target. *Monoclonal Antibody Therapy Prog Allergy*. 1988; 45:121-46.

54. McClelland A., Kuhn L.C., Ruddle F.H. The human transferrin receptor gene: genomic organization, and the complete primary structure of the receptor deduced from a cDNA sequence. *Cell*. 1984; 39:267-74.

55. Schneider C., Owen M.J., Banville D., Williams I.G. Primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence. *Nature*. 1984; 311:675-8.

56. Dargermon C., Le Bivic A., Rothenberger S., Iacopetta B., Kuhn L.C. The internalization signal and the phosphorylation site of transferrin receptor are distinct from the main basolateral sorting information. *EMBO J*. 1993; 12:1713-21.

57. Jing S.Q., Spencer T., Miller K., Hopkins C., Trowbridge I.S. Role of the human transferrin receptor cytoplasmic domain in endocytosis: Localization of a specific signal sequence for internalization. *J Cell Biol*. 1990; 110:283-94.

58. De Castro S. Proteínas fijadoras del hierro. En De Castro S. (ed). *Metabolismo del hierro normal y patológico*. Salvat-Masson. 1995.

59. Huebers H.A., Csiba E., Huebers E., Finch C.A. Competitive advantage of diferric transferrin in delivering iron to reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983; 80:300-4.

60. Huebers H.A., Csiba E., Josephson B., Huebers E., Finch C.A. Interaction of human diferric transferrin with reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981; 78:621-5.
61. Miller Y.E., Jones C., Scoggin C., Morse H., Seligman P. Chromosome 3q(22-ter) encodes the human transferrin receptor. *Am J Hum Genet*. 1983; 35:573-83.
62. Pearse B.M.F. On the structural and functional components of coated vesicles. *J Mol Biol*. 1978; 126:803-12.
63. Wileman T., Harding C., Stahl P. Receptor-mediated endocytosis. *Biochem J*. 1985; 232:1-14.
64. Van Renswoude J.K., Bridge K.R., Harford J.B., Klausner R.D. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and the uptake of iron in K562 cells: identification of a non-lysosomal acidic compartment *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982; 79:6186-90.
65. Rao K., Vall Renswoude J., Kempf C., Klausner R.D. Separation of Fe³⁺ from transferrin in endocytosis: Role of the acidic endosome. *FEBS Lett*. 1983; 160:213-6.
66. Dickson R.B., Hanover J.A., Willingham M.C., Pastan I. Prelysosomal divergence of transferrin and epidermal growth factor during receptor-mediated endocytosis. *Biochemistry*. 1983; 22:5667-71.
67. Dautry-Varsat A., Ciechanover A., Lodish H.F. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983; 80:2258-62.
68. Harding C., Heuser J., Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol*. 1983; 97:329-39.
69. Testa U., Kuhn M., Petrini M., Quaranta M.T., Pelosi E., Peschle C. Differential regulation of iron regulatory element binding protein in cell extracts of activated lymphocytes versus monocytes-macrophages. *J Biol Chem*. 1991; 266:13925-30.
70. Neckers L.M. Regulation of transferrin receptor expression and control of cell growth. *Pathobiology*. 1991; 59:11-8.
71. Irie S., Tavassoli M. Transferrin-mediated cellular iron uptake. *Am J Med Sci*. 1987; 293:103.
72. Klausner R.D., Rouault T.A., Harford J.B. Regulating of the fate of mRNA: The control of cellular iron metabolism. *Cell*. 1993; 72:19-28.
73. Leibold E.A., Laudano A., Yu Y. Structural requirements of iron-responsive elements for binding of the protein involved in both transferrin

- receptor and ferritin mRNA post-transcriptional regulation. *Nucl Acid Res.* 1990; 18:1819-24.
74. Roualt T.A., Stout C.D., Kuptain S., Harford J.B., Klausner R.D. Structural relationship between an iron-regulated RNA-binding protein (IRE-BP) and aconitase: functional implications. *Cell.* 1991; 64:881-3.
75. Roualt T., Rao K., Harford J., Mattia E., Klausner R.D. Hemin chelatable iron and the regulation of transferrin receptor biosynthesis. *J Biol Chem.* 1985; 260:14862-6.
76. Cammack R. A new use for an old enzyme. *Curr Biol.* 1993; 53: 41-3.
77. Testa U., Camagna A., Gianella C., y cols. Expression of transferrin receptors: differential regulatory mechanisms in monocytes-macrophages versus other hematopoietic cells. *Ann NY Acad Sci USA.* 1987; 511:131-7.
78. Testa U., Petrini M., Quaranta M.T., y cols. Iron up-modulates the expression of transferrin receptors during monocyte-macrophage maturation. *J Biol Chem.* 1991; 264:13181-7.
79. Klausner RD, Van Renswoude J., Ashwell G., y cols. Receptor mediated-endocytosis of transferrin in K562 cells. *J Biol Chem.* 1983; 258:4715-24.
80. Ajioka R.S., Kaplan J. Intracellular pools of transferrin receptors result from constitutive internalization of unoccupied receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83:6445-9.
81. Davis R.J., Faucher M., Racaniello L.K., Carruthers A., Czech M.P. Insulin-like growth factor I and epidermal growth factor regulate the expression of transferrin receptors at the cell surface by distinct mechanisms. *J Biol Chem* 1987; 262:13126-31.
82. Pelosi Testa E., Testa U., Samoggia P., Salvo G., Camagna A. Expression of transferrin receptor in human erythroleukemic lines: Regulation in the plateau and exponential phase of growth. *Cancer Res.* 1986; 46:5330-4.
83. Sawyer S.T., Krantz S.B. Transferrin receptor number, synthesis, and endocytosis during erythropoietin-induced maturation of friend virus-infected erythroid cells. *J Biol Chem.* 1986; 261:9187-95.
84. Rhyner K., Taetle R., Bering H., To D. Transferrin receptor regulation is coupled to intracellular ferritin in proliferating and differentiating HL80 leukemia cells. *J Cell Physiol.* 1985; 125:808-12.
85. Lovett D., Kozan B., Hadam M., y cols. Macrophage cytotoxicity: interleukin 1 as a mediator of tumor cytostasis. *J Immunol.* 1986; 136:340-9.

86. Bridges K.R., Cudkowicz A. Effects of iron chelators on the transferrin receptor in K562 cells. *J Biol Chem.* 1984; 259:12970-7.
87. Bezkorovainy A. Biochemistry of nonheme iron in man. I. Iron proteins and cellular iron metabolism. *Clin Physiol Biochem.* 1989; 7:1-17 .
88. Pollack S. Receptor-mediated iron uptake and intracellular iron transport. *Am J Hematol.* 1992; 39:113-8.
89. Weaver J., Pollack S. Two types of receptors for iron on mitochondria. *Biochem J.* 1990; 271:463-6.
90. Jacobs A. Ferritin: An interim review. *Curr Top Hematol.* 1985; 15:25-62.
91. Bakker G.R., Boyer R.F. Iron incorporation into apoferritin. The role of apoterritin as a ferroxidase. *J Biol Chem.* 1986; 261:13182-85.
92. Funk F., Lenders J.P., Crichton R.R., Schneider W. Reductive mobilisation of ferritin iron. *Eur J Biochem.* 1985; 152:167-72.
93. Watt G.D., Frankel R.B., Papaefthymiou G.C. Reduction of mammalian ferritin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985; 82:3640-43.
94. Thomas C.E., Aust SD. Reductive release of iron from ferritin by cation free radicals of paraquat and other bipyridyls. *J Biol Chem.* 1986; 261:13064-70.
95. Drysdale JW. Human ferritin gene expression. *Prog Nucleic Acid Res.* 1988; 35:127-55.
96. Yonijn A.M., Carmel N., Levy R., Hershko C. Ferritin synthesis in inflammation. II. Mechanism of increased ferritin synthesis. *Br J Haematol.* 1981; 49:361-70.
97. Torti S.V., Kwak E.L., Miller S.C., Miller L.L., Ringold G.M., Myambo K.B., Young A.P., Torti F.M. The molecular cloning and characterization of murine ferritin heavy chain, a tumor necrosis factor-inducible gene. *J Biol Chem.* 1988; 263:12638-44.
98. Theil E.C. Ferritin: structure, gene regulation and cellular function in animals. plants and microorganisms. *Ann Rev Biochem.* 1987; 56:289-315.
99. Mack U., Powell L.W., Halliday J.W. Detection and isolation of a hepatic membrane receptor for ferritin. *J Biol Chem.* 1983; 258: 4672-5.
100. Fargion S., Arosio P., Fracanzani A.L., Cislighi V., Levi S., Piperno A., Fiorelli G. Characteristics and expression of binding sites specific for ferritin H-chain on human cell lines. *Blood.* 1988; 71:753-7.
101. Joshiz J.G., Zimmerman A. Ferritin: an expanded role in metabolic regulation. *Toxicology.* 1988; 48:21-9.

102. Broxmeyer H.E., Bognacki J., Dorner M.H., de Sousa M. The identification of leukemia-associated inhibitory activity (LIA) as acidic isoferritins: a regulatory role for acidic isoferritins in the production of granulocytes and macrophages. *J Exp Med.* 1981; 153:1426-44.
103. Matzner Y., Hershko C., Polliack A., Konijn A.M., Izak G., Suppressive effect of ferritin on in vitro lymphocyte function. *Br J Haematol.* 1979; 42:345-53.
104. Matzner Y., Konijn A.M., Shlomain Z., Ben-Basset H. Differential effects of isolated placental isoferritins on in vitro T-lymphocyte function. *Br J Haematol.* 1985; 59: 443-48.
105. Wixom R.L., Prutkin L., Munro H.N. Hemosiderin: nature, formation, and significance. *Int Rev Exp Pathol.* 1979; 22:193-225.
106. Shoden A., Gabrio B.W., Finch C.A. The relationship between ferritin and hemosiderin in rabbits and man. *J Biol Chem.* 1953; 204:823-30.
107. O'Connell M.J., Halliwell B., Moorehouse C.P., Aruoma O.I., Baum H., Peters T.J. Formation of hydroxyl radicals in the presence of ferritin and haemosiderin. Is haemosiderin formation a biological protection mechanism?. *Biochem J.* 1986; 234:727-31.
108. Dallman P.R., Siimes M.A., Stekel A. Iron deficiency in infancy and childhood. *Am J Clin Nutr.* 1980; 33:86-118.
109. Cook J.D. Iron-deficiency anaemia. *Baill Clin Haematol.* 1994; 7:787-804.
110. Baker S.J., DeMaeyer E.M. Nutritional anaemia: Its understanding and control. with special reference to the work of World Health Organization. *Am J Clin Nutr.* 1979; 32:368.
111. Fleming A.F. Iron deficiency in the tropics. *Clin Haematol.* 1982; 11:365.
112. Hallberg L., Hogdahl A.M., Nilsson L., Rybo G. Menstrual blood loss: a population study. *Acta Obst Gyn Scand.* 1966; 45:320-51.
113. Rockey D.C., Cello J.P. Evaluation of the gastrointestinal tract in patients with iron deficiency anemia. *N Eng J Med.* 1993; 329:1691-5. 125. Vercellini P., Vendola N., Ragni G., et cols. Abnormal uterine bleeding associated with iron deficiency anemia. *J Reprod Med.* 1983; 38:502-4.
114. Milman N., Kirchhoff M. Influence of blood donation on iron stores assessed by serum ferritin and haemoglobin in a population survey of 1433 Danish males. *Eur J Haematol.* 1991; 47:134-9.
115. Milman N., Kirchhoff M. The influence of blood donation on iron stores assessed by serum ferritin and hemoglobin in a population survey of 1359 Danish women. *Ann Hematol.* 1991; 63:27-32.

116. Cook J.D. The effect of endurance training on iron metabolism. *Semin Hematol.* 1994;
117. Graham D.Y., Smith J.L. Aspirin and the stomach. *Ann Int Med.* 1986; 104:390-8.
118. Cook J.D., Skikne B.S. Iron deficiency: definition and diagnosis. *J Intern Med.* 1989; 226:349-55.
119. Bainton DF, Finch CA. The diagnosis of iron deficiency anemia. *Am J Med.* 1964; 37:62-70.
120. Uchida T. Change in red blood cell distribution width with iron deficiency. *Clin Lab Haemat.* 1989; 11:117-121.
121. Cartwright G.E. The anemia of chronic disorders. *Semin Hematol.* 1966; 3:351-
122. Sears D.A. Anemia of chronic disease. *Med Clin North Am.* 1992; 76:567-79.
123. Cash J.M., Sears D.A. The anemia of chronic disease: Spectrum of associated diseases in a series of unselected hospitalized patients. *Am J Med.* 1989; 87:638-
124. Beamish M.R., Davies A.G., Eakins J.D., y cols. The measurement of reticuloendothelial iron release using iron-dextran. *Br J Haematol.* 1971; 21:617-
125. Freireich E.F., Miller A., Emerson C.P., y cols. The effect of inflammation on the utilization of erythrocyte and transferrin-bound radioiron for red cell production. *Blood* 1957; 12:972-
126. Bentley D.P., Cavill I., Ricketts C., y cols. A method for the investigation of reticuloendothelial iron kinetics in man. *Br J Haematol.* 1979; 43:619-
127. Vreugdenhil G., Kroos M.J., van Eijk H.G., y cols. Impaired iron uptake and transferrin binding by erythroblasts in the anaemia of rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 1990; 29:335-
128. Strandberg O. Anemia in rheumatoid arthritis. *Acta Med Scand.* 1966; Suppl 454:1-
129. Beguin Y., Huebers H.A., Weber G., et al. Hepatocyte iron release in rats. *J Lab Clin Med.* 1989; 113:336-
130. Fillet G., Cook J.D., Finch C.A.: Storage iron kinetics. VII. A biologic model for reticuloendothelial iron transport. *J Clin Invest.* 1974; 53:1527-
131. Temple J.J., Stuckey W.J. Mechanisms contributing to the anemia associated with localized solid tumor. *Am J Med Sci.* 1986; 292:277-
132. Johnson C.S., Keckler D.J., Topper M.I., y cols. In vivo hematopoietic effects of recombinant interleukin-1 alpha in mice: Stimulation of

- granulocytic, monocytic, megakariocytic, and early erythroid progenitors suppression of late-state erythropoiesis, and reversal of erythroid suppression with erythropoietin. *Blood*. 1989; 73:678-83.
133. Birgens H.S., Kristensen L.O., Borregaard N., y cols. Lactoferrin-mediated transfer of iron to intracellular ferritin in human monocytes. *Eur J Haematol*. 1988; 41:52-
134. Gordeuk V.R., Prithviraj P., Dolinar T., y cols. Interleukin-1 administration in mice produces hypoferrremia despite neutropenia. *J Clin Invest*. 1988; 82:1934-
135. Baynes R., Bezwoda W., Bothwell T, y cols. The non-immune inflammatory response: Serial changes in plasma iron, iron binding capacity, lactoferrin, ferritin, and C reactive protein. *Scand J Clin Lab Invest*. 1986; 46:695-
136. Finch C.A., Bellotti V., Stray S., y cols. Plasma ferritin determination as a diagnostic tool. *West J Med*. 1986; 145:657-
137. Huber D.H., Landmann R., Orth B., Wachter H., Fuchs D. Associations between the activation of macrophages, changes of iron metabolism and the degree of anaemia in patients with malignant disorders. *Eur J Haematol*. 1992; 48:244-8.
138. Ward H.P., Kurnick J.E., Pisarczyk M.J. Serum levels of erythropoietin in anemias associated with chronic infection, malignancy, and primary hematopoietic disease. *J Clin Invest*. 1971; 50:332-
139. Reid C.D.L., Prouse P.J., Baptista L.C., y cols. The mechanism of the anaemia in rheumatoid arthritis: Effects of bone marrow adherent cells and of serum on in-vitro erythropoiesis. *Br J Haematol*. 1984; 58:607-
140. Roodman G.D., Horadam V.W., Wright T.L. Inhibition of erythroid colony formation by autologous bone marrow adherent cells from patients with the anemia of chronic disease. *Blood*. 1985; 62:406-
141. Means R.T., Krantz S.B. Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease. *Blood*. 1992; 80: 1639-47.
142. Erslev A. Erythropoietin. *N Engl J Med*. 1991; 324:1339-44.
143. Dinant H.J., deMaat C.E.M. Erythropoiesis and mean red-cell lifespan in normal subjects and in patients with the anaemia of active rheumatoid arthritis. *Br J Haem*. 1978; 39:437-
144. Halliday J.W., Powell L.W. Iron overload. *Semin Hematol*. 1982; 19:42-53.
145. Mc Laren G.D., Muir W.A., Keller Meyer R.W. Iron overload disorders: natural history, pathogenesis, diagnosis and therapy. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci*. 1983; 19:205-66.

146. Finch S.C., Finch C.A. Idiopathic hemochromatosis, an iron storage disease. Iron metabolism in hemochromatosis. *Medicine (Baltimore)*. 19; 34:381-430.
147. Gutteridge J.M.C., Rowley D.A., Griffiths E., y cols. Low molecular weight iron complexes and oxygen radical reactions in idiopathic haemochromatosis. *Clin Sci*. 1985; 68:463-7.
148. Al Refaie F.N., Wickens D.G., Wonke B., y cols. Serum non transferrin bound iron in beta thalassaemia major patients treated with desferrioxamine and L1. *Br J Haematol*. 1992; 82:431-6.
149. Ichiro Ochai I. Free radicals and metals in biology. *J Chem Educ*. 1993; 70:128-33.
150. Gutteridge J.M.C. Iron and oxygen: A biologically damaging mixture. *Acta Paediatr Scand*. 1989; 361:78-85.
151. Milder M.S., Cook J.D., Stray S., Finch C.A. Idiopathic hemochromatosis. An interim report. *Medicine (Baltimore)* 1980; 59:34-49.
152. Edwards C.Q., Skolnick M.H., Kushner J.P. Hereditary hemochromatosis: contributions of genetic analyses. *Prog Hematol*. 1981; 12:43-71
153. Valberg L.S., Ghent C.N. Diagnosis and management of hereditary hemochromatosis. *Annu Rev Med*. 1985; 36:27.
154. Edwards C.Q., Carroll M., Bray P., Cartwright G.E. Hereditary hemochromatosis: diagnosis in siblings and children. *N Engl J Med*. 1977; 297:7-.
155. Brink B., Disler P., Lynch S., Jacobs P., Charlton R., Bothwell T. Patterns of iron storage in dietary iron overload and idiopathic hemochromatosis. *J Lab Clin Med*. 1977; 88:725-31.
156. Easley R.M. Jr., Schreiner B.D. Jr., Yu P.N. Reversible cardiomyopathy associated with hemochromatosis. *N Engl J Med*. 1972; 287:866.
157. Niederau C., Fischer R., Sonnenberg A. y cols.. Survival and causes of death in cirrhotic and noncirrhotic patients with primary hemochromatosis. *N Engl J Med*. 1985; 313:1256-62.
158. Askari A.D., Muir W.A., Rosner I.A., y cols. Arthritis of hemochromatosis: Clinical spectrum, relation to histocompatibility antigens, and effectiveness of early phlebotomy. *Am J Med*. 1983; 75:957.
159. Edwards C.Q., Kelly T.M., Ellwein G., y cols. Thyroid disease in hemochromatosis: Increased incidence in homozygous men. *Arch Intern Med*. 1983; 143:1890.

160. Propper R.D., Cooper B., Rufo R.R., y cols. Continuous suocutaneous administration of deferrioxamine in patients with iron overload. *N Engl J Med.* 1977; 297:418-23.
161. Pippard M.J., Callender S.T., Weatherall D.J. Intensive iron-chelation therapy with desferrioxamine in iron-loading anaemias. *Clin Sci Mol Med.* 1978; 54:99-106.
162. Fillet G. *Le fer dans l'organisme: metabolisme et reutilisation.* Paris: Madison, 1977.
163. Dacie J.V., Lewis S.M. *Practical Haematology,* Churchill Livingstone, Edinburgh.
164. Hastka J., Lasserre J.J., Schwarzbeck., y cols. Laboratory tests of iron status: correlation or common sense?. *Clin Chem.* 1996; 42:718-
165. Gimferrer E. El perfil férrico hemático. *Bio-ferrum.* 1995: 1:6-16.
166. Haskins D., Stevens A.R. Jr., Finch S.C., Finch C.A. Iron metabolism: iron stores in man as measured by phlebotomy. *J Clin Invest.* 1952; 31:543-7.
167. Torrance J.D., Bothwell T.H. Tissue iron stores. En: *Iron. Methods in hematology. Vol I.* (ed Cook J.D.), Churchill Livingstone, New York. pp 90-115.
168. Gale E., Torrance J., Bothwell T. The quantitative estimation of total iron stores in human bone marrow. *J Clin Invest.* 1963; 42:1076-82.
169. Barry M., Sherlock S. Measurement of liver-iron concentration in liver-biopsy specimens. *Lancet.* 1971; 100-103.
170. Rath C.E., Finch C.A. Sternal marrow hemosiderin: a method for determination of available iron stores in man. *J Lab Clin Med.* 1948; 33:81.
171. Lundin P. Comparison of hemosiderin estimation in bone marrow sections and bone marrow smears. *Acta Med Scand.* 1964; 175:384.
172. Engel J.P., Schein O.D., Conley C.L. Bone marrow hemosiderin does not always reflect body iron stores. *Arch Intern Med.* 1982; 142:287.
173. Jacobs A., Worwood J. Ferritin in serum. *N Engl J Med.* 1975; 292:951.
174. Custer G., Balcerzak S., and Rinehart J. Human macrophage hemoglobin-iron metabolism in vitro. *Am J Hematol.* 1982; 13:23-36.
175. Lipschitz D.A., Cook J.D., Finch C.A. A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores. *N Eng J Med.* 1974; 290:1213-6. 195. Means R.T., Krantz S.B. Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease. *Blood.* 1992; 80: 1639-47.

176. Miles L.E.M., Lipschitz D.A., Bieber C.P., Cook J.D. Measurement of serum ferritin by a 2-site immunoradiometric assay. *Anal Biochem.* 1974; 61:209-24.
177. Hansen T.M. Serum ferritin and the assessment of iron deficiency in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 1983; 12:353.
178. Funchs D., Zangerle R., Artner Divorzak E., y cols. Association between immune activation, changes in iron metabolism and anemia in HIV infection. *Eur J Haematol.* 1993; 50:90-4.
179. Matzner Y., Konijn A.M., Hershko C. Serum ferritin in hematologic malignancies. *Am J Hematol.* 1980; 9:13.
180. Worwood M., Dawkins S., Wagstaff M., Jacobs A. The purification and properties of ferritin from human serum. *Biochem J.* 1976; 157:97-103.
181. Cragg S.J., Wagstaff M., and Worwood M. Detection of a glycosylated subunit in human serum ferritin. *Biochem J.* 1981; 199:565-71.
182. Dallman P.R. Diagnosis of anemia and iron deficiency: analytic and biological variations of laboratory tests. *Am J Clin Nutr.* 1984; 39:937.
183. International Committee for Standardization in Haematology. Revised recommendations for the measurements of the serum iron in human blood. *Br J Haematol.* 1990; 75:615-6.
184. Persijn J.P., van der Slik W., Riethorst A. Determination of serum iron and latent iron-binding capacity (LIBC). *Clinica Chimica Acta.* 1971; 35:91-8.
185. Bandi Z.L., Schoen I., Bee D.E. Immunochemical methods for measurement of transferrin in serum: Effects of analytical errors and inappropriate reference intervals on diagnostic utility. *Clin. Chem.* 1985; 31:1601-5.
186. Labbe R.F., Rettmer R.L. Zinc protoporphyrin: a product of iron-deficient erythropoiesis. *Seminars Hematol.* 1989; 26:40-6.
187. Yip R., Chwartz S., Deinard A.S. Screening for iron deficiency with the erythrocyte protoporphyrin test. *Pediatrics.* 1983; 72:214-9.
188. Hastka J., Lasserre J.J., Schwartzbeck A., Strauch M., and Hehlmann R. (1993) Zinc protoporphyrin in anemia of chronic disorders. *Blood.* 1993; 81:1200-4.
189. Cazzola M., Dezza L., Bergamaschi G., y cols. Biologic and clinical significance of red cell ferritin. *Blood.* 1983; 62:1078-87.
190. Van der Weyden M.B., Fong H., Salem H., y cols. Erythrocyte ferritin content in idiopathic haemochromatosis and alcoholic liver disease with iron overload. *Br Med J.* 1983; 286:752.

191. Witte D.L. Can serum ferritin be effectively interpreted in the presence of the acute phase response?. *Clin Chem.* 1991; 37:484-5.
192. Bassett M.L., Halliday J.W., Ferris R.A., Powell L.W. Diagnosis of hemochromatosis in young subjects: predictive accuracy of biochemical screening tests. *Gastroenterology.* 1984; 87:628-33.
193. Aldouri M.A., Wonke B., Hoffbrand A.V. y cols. Iron state and hepatic disease in patients with thalassaemia major, treated with long term subcutaneous desferrioxamine. *J Clin Pathol.* 1987; 40:1353-9.
194. Maurer H.S., Lloyd-Still J.D., Ingrisano C., Gonzalez-Crussi F., Honig G.R. A prospective evaluation of iron chelation therapy in children with severe B-thalassemia. *Am J Dis Children.* 1988; 142:287-92.
195. Chernow B., Wallner S.F. Is the anemia of chronic disorders normocytic-normochromic?. *Milit Med.* 1978; 143:345-
196. Witte D.L., Dick F.R., Goeken J., Johnson G., Pennell B. C-reactive protein (CRP) aids interpretation of serum ferritin. *Clin Chem* 1985; 31:1011.
197. Witte D.L., Kraemer D.F. Johnson G.F. Dick F.R., Hamilton H. Prediction of bone marrow iron findings from tests performed on peripheral blood. *Am J Clin Pathol.* 1986; 85:202-6.
198. Witte D.L., Angstadt D.S., Davis S.H., Schrantz R.D. Predicting bone marrow iron stores in anemic patients in a community hospital using ferritin and erythrocyte sedimentation rate. *Am J Clin Pathol* 1988; 90:85-7.
199. Coenen J.L.L.M., van Dieijen-Visser M.P., van Pelt J., y cols. Measurements of serum ferritin used to predict concentrations of iron in bone marrow in anemia of chronic disease. *Clin Chem.* 1991; 37:560-3..
200. Guyatt G.H., Patterson C., Ali M., y cols. Diagnosis of iron-deficiency anemia in the elderly. *Am J Med.* 1990; 88:205-9.
201. Blumberg A.B., Mart H.R.M., Graber C.G. Serum ferritin and bone marrow iron in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Am Med Assoc.* 1983; 250:3317-9.
202. Milman N., Bangsboll S., Strandberg Pedersen N., Visfeldt J. Serum ferritin in non-dialysis patients with chronic renal failure: Relation to bone marrow iron stores. *Scand J Haematol.* 1983; 30:337-44.
203. Chitambar C.R., Zivkovic Z. Release of soluble transferrin receptor from the surface of human leukemic HL60 cells. *Blood.* 1989; 74: 602-8.
204. Baynes R.D., Shih Y.J., Hudson B.G., Cook J.D. Characterization of immunoreactive transferrin receptor externalized by K562 erythroleukemic cells. *Blood.* 1990. 76:25a.

205. Baynes R.D., Shih Y.J., Cook J.D. Production of soluble transferrin receptor by K562 erythroleukemia cells. *Br J Haematol.* 1991; 78:450-5.
206. Kohgo Y., Nishisato T., Kondo H., Tsushima N., Nitsu Y., Urushizaki I. Circulating transferrin receptor in human serum. *Br J Haematol.* 1986; 64:277-81.
207. Kohgo Y., Niitsu Y, Nishisato T., Kato J., Sasaki K., Tsushima N., Hirayama M., Kondo H., Urushizaki, I. Externalization of transferrin receptor in established human cell lines. *Cell Biol.* 1987; 11:871-9.
208. Chitambar C.R., Loebel A.L., Noble N.A. Shedding of transferrin receptor from rat reticulocytes during maturation in vitro soluble receptor is derived from receptor shed in vesicles. *Blood.* 1991; 78:2444-50.
209. Johnstone R.M., Mathew A., Mason A.B., Teng K. Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins. *J Cell Physiol.* 1991; 147:27-36.
210. Ahn J., Johnstone R.M. Origin of a soluble truncated transferrin receptor. *Blood.* 1993; 81:2442-51.
211. Beguin Y., Huebers H.A., Josephon B., Finch C.A. Transferrin receptors in rat plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85:637-40.
212. Huebers H.A., Beguin Y., Pootrakul P., Einspahr D., Finch C.A. Intact transferrin receptors in human plasma and their relation to erythropoiesis. *Blood.* 1990; 75:102-7.
213. Shih Y.J., Baynes R.D., Hudson B.G., Flowers C.H., Skikne B.S., Cook J.D. Serum transferrin receptor is a truncated form of tissue receptor. *J Biol Chem.* 1990; 265:19077-81.
214. Shih Y., Baynes R.D., Hudson B.G., Cook J.D. Characterization and quantitation of the circulating forms of serum transferrin receptor using domain specific antibodies. *Blood.* 1993; 81:234-8.
215. Shintani N., Kohgo Y., Kato J., Kondo H., y cols. Expression and extracellular release of transferrin receptors during peripheral erythroid progenitor cell differentiation in liquid culture. *Blood.* 1994; 83:1209-15.
216. Baynes R.D., Shih Y.J., Cook J.D. In vitro and vivo quantitation of soluble and exosome forms of the transferrin receptor. *Blood.* 1991; 78:89a.
217. Baynes R.D., Shih Y.J., Hudson B.G., Cook J.D. Identification of the membrane remnants of transferrin receptor with domain specific antibodies. *J Lab Clin Med.* 1994; 123:407-14.

218. Flowers C.H., Skikne B.S., Covell A.M., Cook J.D. The clinical measurement of serum transferrin receptor. *J Lab Clin Med.* 1989; 114:368-77.
219. Heaney M.L., Golde D.W. Soluble hormone receptors. *Blood.* 1993; 82:1945-8.
220. Pan B.T., Johnstone R.M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell.* 1983; 33:967-78.
221. Pan B.T., Johnstone R. Selective externalization of the transferrin receptor by sheep reticulocytes in vitro. Response to ligands and inhibitors of endocytosis. *J Biol Chem.* 1984; 259:9776-82.
222. Pan B.T., Teng K., Wu C., Adam M., Johnstone R.M. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol.* 1985; 101:942-948.
223. Johnstone R.M., Adam M., Hammond J.R., Orr L., Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem.* 1987; 262:9412-20.
224. Johnstone R.M., Bianchini A., Teng K. Reticulocyte maturation and exosome release: Transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions. *Blood.* 1989; 74:1844-51.
225. Baynes R.D., Shih Y.J., and Cook J.D. Mechanism of soluble transferrin receptor production as determined by domain specific antibodies. *Blood.* 1992; 80:278a.
226. Baynes R.D., Shih Y.J., Hudson B.G., Cook J.D. Production of the serum form of the transferrin receptor by a cell membrane associated serine protease. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1993; 204:65-9.
227. Hayes G.R., Enns C.A., Lucas J.J. Identification of the O-linked glycosylation site of the human transferrin receptor. *Glycobiology.* 1992; 2:355-9.
228. Do S.I., Cummings R.D. Presence of O-linked glycosylation site of the human transferrin receptor. *Glycobiology.* 1992; 2:345-53.
229. Suominen P., Punnonen K., Rajamaki A., Irjala K. Evaluation of new immunoenzymometric assay for measuring soluble transferrin receptor to detect iron deficiency in anemic patients. *Clin Chem.* 1997; 43:1641-6.
230. Cooper M.J., Zlotkin S.M. Day to day variation of transferrin receptor and ferritin in healthy men and women. *Am J Clin Nutr.* 1996; 64:738-42.
231. Virtanen M., Siimes M.A., Krusius T., Pettersson T., Teppo A.M., Viinikka L. Evaluation of an ELISA test for determination of the serum

- transferrin receptor. Demonstration of discordance between results obtained with two methods. *Scand LJ Clin Lab Invest.* 1998; 58:561-7.
232. Department of Nutritional Sciences, University of Toronto, Research Institute, The Hospital of Sick Children, ON, Canada. Disparity of serum transferrin receptor measurement among different assay methods. *Eur J Clin Nutr.* 1998; 52:801-4.
233. Virtanen M.A., Viinikka L.U., Virtanen M.K., Svahn J.C., Anttila R.M., Krusius T., Cook J.D., Axelsson I.E., Raiha N.C., Siimes M.A. Higher concentrations of serum transferrin receptor in children than in adults. *Am J Clin Nutr.* 1999; 69:256-60.
234. Allen J., Backstrom K.R., Cooper J.A., Cooper M.C., y cols. Measurement of soluble transferrin receptor in serum of healthy adults. *Clin Chem.* 1998; 44:35-39.
235. Beguin Y., Clemons G.K., Pootrakul P., Fillet G. Quantitative assessment of erythropoiesis and functional classification of anemia based on measurements of serum transferrin receptor and erythropoietin. *Blood.* 1993; 81:1067-76.
236. Beguin Y., Loo M., Zik S.R., y cols. Early prediction of response to recombinant human erythropoietin in patients with the anemia of renal failure by serum transferrin receptor and fibrinogen. *Blood.* 1993; 82:2010-6.
237. Barosi G., Merlo C., Palestra P., y cols. Variations in erythropoiesis and serum ferritin during erythropoietin therapy for anaemia of end-stage renal disease. *Acta Haematol.* 1993; 90:13-8.
238. Ponchio L., Beguin Y., Farina G., y cols. Evaluation of erythroid marrow response to recombinant human erythropoietin in patients with cancer anaemia. *Haematologica.* 1992, 77:494-501.
239. De Paoli Vitali E., Ricci G., Perini L., y cols. The determination of plasma transferrin receptor as a good index of erythropoietic activity in renal anemia and after renal transplantation. *Nephron.* 1996; 72:552-6.
240. Hou C.C., Wu S.C., Yang W.C., Huang T.P., NG Y.Y. Serum transferrin receptor concentration is not indicative of erythropoietic activity in chronic hemodialysis patient with poor response to recombinant human erythropoietin. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih (Taipei).* 1998; 61:456-62.
241. Carmel R., Skikne B.S., Serum transferrin receptor in the megaloblastic anemia of cobalamin deficiency. *Eur J Haematol.* 1992; 49:246-50.

242. Neckers L.M., Cossman J. Transferrin receptor induction in mitogen stimulated human T lymphocytes is required for DNA synthesis and is regulated by interleukin-2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983; 89:3494-8.
243. Hamilton T.A. Regulation of transferrin receptor expression in concanavalin A stimulated and Gross virus transformed rat lymphoblasts. *LJ Cell Physiol*. 1982; 113:40-6.
244. Pelosi Testa E., Samoggia P., Giannella G., y cols. Mechanisms underlying T-lymphocyte activation: mitogen initiates and IL-2 amplifies the expression of transferrin receptors via intracellular iron level. *Immunology* 1988. 64:273-9.
245. Kemp J.D. The role of iron and iron binding proteins in lymphocyte physiology and pathology. *J Clin Immunol*. 1993; 13:81-92.
246. Maes M., Bosmans E., Scharpe S., y cols. Components of biological variation in serum soluble transferrin receptor: relationships to serum iron, transferrin and ferritin concentrations, and immune and haematological variables. *Scand J Clin Invest*. 1997; 57:31-41.
247. Zoli A., Altomote L., Mirone L., y cols. Serum transferrin receptors in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1994; 53:699-701.
248. Feelders R.A., Vreugdenhil G., Eggermont A.M., Kuiper-Kramer P.A., van Eijk H.G., Swak A.J. Regulation of iron metabolism in the acute-phase response: interferon gamma and tumour necrosis factor alpha induce hypoferraemia, ferritin production and a decrease in circulating transferrin receptors in cancer patients. *Eur J Clin Invest*. 1998; 28:520-7.
249. Ferguson B.J., Skikne B.S., Simpson K.M., y cols. Serum transferrin receptor distinguishes the anemia of chronic disease from iron deficiency anemia. *J Lab Clin Med*. 1992; 119:385-90.
250. Kuvibidila S., Warriar R.J., Ode D.L., Yu L.C. Serum transferrin receptor concentrations in women with mild malnutrition. *Am J Clin Nutr*. 1996. 63:596-601.
251. Skikne B.S., Flowers C.H., Cook J.D. Serum transferrin receptor: A quantitative measure of tissue iron deficiency. *Blood*. 1990; 75:1870-6.
252. Suominen P., Punnonen K., Rajamaki A., Irjala K. Serum transferrin receptor and transferrin receptor-ferritin index identify healthy subjects with subclinical iron deficits. *Blood*. 1998; 92:2934-9.
253. Kohgo Y., Niitsu Y., Kondo H., Kato J., Tsushima N., Sasaki K., Hirayama M., Numata T., Nishisato T., Urushizaki I. Serum transferrin receptor as a new index of erythropoiesis. *Blood*. 1987; 70:1955-8.

254. Zhu Y.I., Haas J.D. Response of serum transferrin receptor to iron supplementation in iron depleted, nonanemic women. *Am J Clin Nutr.* 1998; 67:271-5.
255. Kuiper Kramer E.P., Baerts W., Bakker R., Van Eyck J., Van Raan J., Van Eijk H.G. Evaluation of the iron status of the new born by soluble transferrin receptors in serum. *Clin Chem Lab Med.* 1998; 36:17-21.
256. Kivivuori S.M., Anttila R., Viinikka L., y cols. Serum transferrin receptor for assessment of iron status in healthy prepubertal and early pubertal boys. *Pediatr Res.* 1993; 34:297-9.
257. Carriaga M.T., Skikne B.S., Finley B., Cutler B., Cook J.D. Serum transferrin receptor for the detection of iron deficiency in pregnancy. *Am J Clin Nutr.* 1991; 54:1077-81.
258. Akesson A., Bjellerup P., Berglund M., Bremme K., Vahter M. Serum transferrin receptor: a specific marker of iron deficiency in pregnancy. *Am J Clin Nutr.* 1998; 68:1241-6.
259. Van den Broek N.R., Letsky E.A., White S.A., Shenkin A. Iron status in pregnant women: which measurements are valid?. *Br J Haematol.* 1988; 103:817-24.
260. Woessner S., Lafuente R., Florensa L. Estudio citológico de los órganos hematopoyéticos. En: *La citología óptica en el diagnóstico hematológico.* Tercera edición. Barcelona. Ediciones Medici. 1991. pp 79.
261. Perls M. Nachweis von Eisenoxyd in gewissen Pigmenten. *Virchows Arch (Pathol. Anat).* 1967; 39:42-8.
262. International Committee for Standardization in Hematology. Recommendations for reference method for hemoglobinometry in human blood (ICSH Standard EP 6/2 : 1977) and specifications for international hemoglobin cyanide reference preparation ((ICSH Standard EP 6/3 : 1977). *J Clin Path.* 1978; 31:139.
263. Bollinger P.B., Drewinko. B., Brailas C.D. The Technicon H-1, an automated hematology analyzer for today and tomorrow. *Am J Clin Pathol.* 1987; 87:71.
264. Van Hove L., Goossens W., Van duppen V., Verwilghen R. Reticulocyte count usingthiazole orange. A flow cytometric method. *Clin Lab Haematol.* 1990; 12:287.
265. Siedel J., Wahlefeld A.W., Ziegenhorn J. A new ferrozine reagent without desproteinization. *Clin Chem.* 1984; 30:975.
266. International Committee for Standardization in Hematology. The measurement fo total and unsaturated iron-binding capacity in serum. *Br J Haematol.* 1978; 38:281.

267. Dubois S., McGovern M., Ehrhardt V. Eisenstoffwechsel-Diagnostik mit Boehringer Mannheim Hitachi-Analysensystemem: ferritin, transferrin, und eisen. *GIT labor-Medizin* 1988; 9; 468-71.
268. International Committee for Standarization in Hematology. Recommendations for measurement of erythrocyte sedimentation rate of human blood. *Am J Clin Pathol.* 1977; 68:505.
269. Sternberg J.C. A rate nephelometer for measuring specific proteins by immune precipitation reactions. *Clin Chem.* 1977; 23:1456-64.
270. Nixon R.K., Olson J.P. Diagnostic value of marrow hemosiderin pattern. *Ann Intern Med.* 1968; 69:1249.
271. Woessner S., Lafuente R., Florensa L. Contribución de la citoquímica al diagnóstico hematológico. En: *La citología óptica en el diagnóstico hematológico*. Tercera edición. Barcelona. Ediciones Medici. 1991. pp 48.
272. Lee G.R. Microcytic anemias and disorders characterized by altered iron metabolism. En Lee G.R., Bithell T.C., Foerster J., Athens J.W., Lukens J.N. (eds). *Wintrobe's Clinical Hematology*. Philadelphia. Lea and Febiger. 1993. pp 791-872.
273. Macdougall I.C., Cavill I., Hulme B., y cols. Detection of functional iron deficiency during erythropoietin treatment: a new approach. *Br Med J.* 1992; 304:225.
274. Ballas S.K. Normal serum iron and elevated total iron binding capacity in iron deficiency states. *Am J Clin Pathol.* 1979; 71:401.
275. Pettersson T., Kivivuori S.M., Siimes M.A. Is serum transferrin receptor useful for detecting iron deficiency in anaemic patients with chronic inflammatory diseases?. *Br J Rheumatol.* 1994; 33:740-4.
276. CascanteV., Fernandez Zamorano A., Larrocha C., Jimenez C., Fernandez de Castro M., Viloria A. Determinación del punto de corte de la ferritina en pacientes sometidos a un estudio de médula ósea. *Química Clínica.* 1997; 16:297.
277. CascanteV., Fernandez Zamorano A., Larrocha C., Buño A., Villamediana J., Espejo F. La concentración de transferrina sérica ayuda a la detección de la ferropenia en los procesos inflamatorios. *Química Clínica.* 1998; 17:195.
278. Cascante V., Fernandez Zamorano A., Fernandez de Castro M., Larrocha C., Jimenez C., Viloria A. Relación entre parámetros indicadores de la deficiencia funcional de hierro. *Química Clínica.* 1997; 16:296.
279. Brugnara C., Colella G.M., Cremins J., y cols. Effects of subcutaneous recombinant human erythropoietin in normal subjects: Development of

- decreased reticulocyte hemoglobin content and iron deficient erythropoiesis. *J Lab Clin Med.* 1994; 123:660-7.
280. Walter T., Olivares M., Pizarro F., Muñoz C. Iron, anemia and infection. *Nutr Rev.* 1997; 55:111-24.
281. Punnonen K., Irjala K., Rajamaki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood.* 1997; 89:1052-7.
282. Remacha A.F. The role of serum transferrin receptor in the diagnosis of iron deficiency. *Haematologica.* 1998; 83:963-6.
283. Maest A.E., Blinder M.A., Gronowski A.M., Chumley C., Scott M.G. Clinical utility of the soluble transferrin receptor and comparison with serum ferritin in several populations. *Clin Chem.* 1998; 44:45-51.
284. Baumann Kurer S., Seifert B., Michel B., y cols. Prediction of iron deficiency in chronic inflammatory rheumatic disease anaemia. *Br J Haematol.* 1995; 91:820-6.
285. Khumalo H., Gomo Z.A., Moyo V.M., Gordeuk V.R., y cols. Serum transferrin receptor are decreased in the presence of iron overload. *Clin Chem.* 1998; 44:40-4.
286. North M., Dallalio G., Donath A.S., y cols. Serum transferrin receptor levels in patients undergoing evaluation of iron stores: correlation with other parameters and observed versus predicted results. *Clin Lab Haem.* 1997; 19:93-7.
287. Feelders R.A., Vreugdenhil G., Manger B., y cols. Serum transferrin receptor levels in anaemia of rheumatoid arthritis and effects of iron chelation treatment. *Eur J Haematol.* 1994; 52:61-2.
288. Kuiper-Kramer P.A., Coenen J.L.L.M., Huisman C.M.S., Abbes A., Van Ran J., Van Eijk H.G. Relationship between soluble transferrin receptors in serum and membrane bound transferrin receptors. *Acta Haematol.* 1998; 99:8-11.
289. Junca J., Fernandez Avilés F., Oriol A., Navarro J.T., Milla F., Sancho J.M., Feliu E. The usefulness of serum transferrin receptor in the anemia of chronic disorders. *Haematologica.* 1998; 83:676-80.
290. Punnonen K., Irjala K., Rajamaki A. Iron deficiency anemia is associated with high concentrations of transferrin receptor in serum. *Clin Chem.* 1994; 40:774-6.
291. Thorstensen K., Egeberg K., Romslo I., y cols. Variations in serum erythropoietin and transferrin receptor during phlebotomy therapy of hereditary hemochromatosis: A case report. *Eur J Haematol.* 1991; 47:219-22.

292. Vreugdenhil G., De Jeu-Jaspers N., Van Eijk H.G., Swaak A.J.G. Correlation of iron exchange between the oral iron chelator LI and transferrin with possible anti-anaemic effects in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1990; 49:956-7.
293. Kontoghiorghes G.J., Sheppard L. Simple synthesis of the oral iron chelators 1-alkyl-3-hydroxy-2-methylpyrid-4-ones. *Inorg Chim Acta.* 1987; 136:L11-L12.
294. Louache F., Testa U., Pelicci P. Regulation of transferrin receptors in human hematopoietic cell lines. *J Biol Chem.* 1984; 259:11567-82.
295. Vreugdenhil G., Feelders R.A., Coppens P.J.W., De Leeuw P.W. Possible mechanisms underlying potentiating effects of iron chelators in hematopoietic response to erythropoietin. *Nephron.* 1992; 61:475-6.