

11218

**UNIVERSIDAD  
NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

13  
20j-



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.  
CENTRO MEDICO NACIONAL**

**DETERMINACION DE LA  
FERRITINA SERICA ENTRE  
DONADORES DE SANGRE  
REMUNERADOS  
Y VOLUNTARIOS.**

**TESIS DE POSGRADO**

Que para obtener el Título de:  
**ESPECIALISTA EN HEMATOLOGIA**

Presenta el Doctor:  
**JULIO EDGAR SELVA PALLARES.**

**MEXICO D.F. ABRIL DE 1992**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

# I N D I C E

---

## INTRODUCCIÓN.

---

I.- BIOQUÍMICA DE LA FERRITINA.	1
Estructura.	1
Síntesis.	5
Captación y liberación del hierro.	9
Isoferritinas.	11
Ferritina circulante.	13

---

II.- FACTORES QUE AFECTAN SUS NIVELES SÉRICOS.	14
Cambios relacionados a la edad y sexo.	16
Deficiencia de hierro.	17
Embarazo.	17
Terapia con hierro.	18
Infección, Inflamación y Enfermedad Crónica.	18
Diálisis renal.	20
Cáncer.	20
Enfermedad hepática crónica.	22
Hemocromatosis.	22
Cirugía gástrica	23

---

---

---

# I N D I C E

---

III.- CONCENTRACION DE FERRITINA SERICA ENTRE DONADORES DE SANGRE REMUNERADOS Y EN DONADORES VOLUNTARIOS.	24
Objetivo .	24
Material biológico.	24
Principio de la prueba.	26
Toma de la muestra.	27
Equipo.	28
Procedimiento.	29
Resultados.	30
Comentario.	36
Bibliografía.	42

---

---

# I N T R O D U C C I O N .

---

La ferritina es una proteína que está presente en el reino tanto vegetal como animal. La ferritina es la segunda proteína con mayor cantidad de hierro en el organismo. Dos terceras partes de los depósitos del hierro se encuentran contenidas en la ferritina, la fracción soluble del hierro no hem tisular. El restante existe como hemosiderina insoluble, el cual es un material heterogéneo compuesto grandemente de ferritina desnaturalizada y pequeñas cantidades de azúcar, ácido siálico, lípidos y otras proteínas (1).

En el adulto masculino la hemoglobina contiene cerca de 3 gramos de hierro y un gramo puede encontrarse en la ferritina (15 a 30%) (2,3,4) y en la hemosiderina. Debido a fluctuaciones de los requerimientos de hierro éste es movilizado de la ferritina (sitio de depósito) para compensarlos como en la pérdida de sangre, cambios en la dieta, embarazo o desarrollo (5,6,7,8,9).

La cantidad promedio de hierro que puede ser movilizado ha sido estimado cuantitativamente mediante flebotomía en cerca de 700mg en el hombre y 230mg en la mujer (4).

La ferritina se encuentra ampliamente distribuida en todos los tejidos pero no existen estudios cuantitativos relativo a ésto, pero se sabe que existen concentraciones elevadas en el hígado y en la médula ósea, aparentemente localizado en las células del reticuloendotelio.

Debido al desarrollo de nuevas técnicas (10,11,12,13,14,43) ha sido posible medir las concentraciones de ferritina circulante y de esta manera estimar la cantidad de hierro de los depósitos en el cuerpo. Esto a dado nueva información para uso clínico y también ha ayudado al reconocimiento de la bioquímica de la ferritina. En la práctica clínica la determinación de la ferritina sérica es un valioso método para la estimación de los depósitos de hierro (14,15) ya que correlaciona directamente con los depósitos corporales del mismo (16).

Además los niveles de ferritina sérica varían menos de día a día que como lo hace el hierro sérico y su capacidad de captación, por lo que la medición de la ferritina sérica es un índice más confiable de los depósitos de hierro que una determinación aislada ya sea del hierro sérico o del porcentaje de saturación (9)(12).

---

---

# I

## BIOQUIMICA DE LA FERRITINA

### ESTRUCTURA QUIMICA Y MORFOLOGIA DE LA FERRITINA

Desde fines del siglo XIX ha sido conocida la existencia de los depósitos de hierro en los tejidos. Neumann en 1868 fue el primero en usar el término "Hemosiderina" para describir el pigmento amarillo café encontrado en el hígado y bazo mediante la tinción con ferrocianato de potasio (Azul de Prusia)(4). Este hierro granular es fácilmente visible bajo el microscopio y es insoluble excepto en ácido, lo que lo diferenció a la forma soluble unida a una proteína a la cual Schmiedeberg llamó "Ferritina" en 1894.

En 1924 Fisher estimó que la hemosiderina por la naturaleza de su insolubilidad no era otra cosa que el hierro elemental dividido finamente con una capa de óxido que le daba su color.

La relación entre hemosiderina y ferritina sigue siendo materia para discusión, ya que

ambos compuestos están aumentados en condiciones de sobrecarga de hierro y están disminuidos o ausentes en estados deficientes. Granick reconoció la función de la ferritina como depósito de hierro y sugirió, que los agregados moleculares de ferritina en los tejidos, gradualmente van creciendo y siendo visibles microscópicamente para luego ser llamados gránulos de hemosiderina. Esta visión ha sido confirmada por estudios de microscopía electrónica, los cuales han mostrado gradaciones de estructura dentro de los gránulos teñidos de hierro de las moléculas empaquetadas de ferritina muy parecidas algunas veces con una estructura cristalina a conglomerados en la cual las moléculas típicas de ferritina pueden ser completa o parcialmente reemplazadas por depósitos amorfos electrodensos de hierro.

Cada molécula de ferritina, se piensa consiste de una concha proteica esférica con un peso molecular de cerca de 450,000 daltons. Determinaciones de peso molecular, análisis de aminoácidos y estudios de difracción de rayos "X" sobre ferritina de bazo de caballo sugieren que hay 24 subunidades, cada una de las cuales pesa 18,500 daltons arregladas en forma de un cubo chato (figura 1). Una variable cantidad de hierro está presente en el centro de cada molécula como un corazón de hidroxifosfato férrico. El hierro es el que le da a la proteína su característico color café.

Cuando la ferritina es aislada de tejidos humanos o animales, consiste de una mezcla de moléculas variables de apoferritina que no contienen hierro. Las completamente saturadas contienen cerca de 4,000 átomos de hierro con un contenido total del mismo de por arriba del 20% de su peso. La saturación de la molécula depende del estado de hierro del sujeto y del tejido en particular examinado. Las moléculas con diferente contenido de hierro son separadas mediante centrifugación de gradiente densidad con un coeficiente de sedimentación para la apoferritina de 17.6 S, el cual es fácilmente diferenciado del sedimento de ferritina rico en hierro, el cual es de 65 S.

Al microscopio electrónico son fácilmente visualizadas las moléculas individuales, el core tenso de hierro tiene un diámetro de cerca de 7nm y puede ser visto sin tinción especial, aunque por su peso no necesariamente tienen una apariencia uniforme. Este hierro cristalino es probablemente depositado al azar dentro de una concha (fig.2) con cuatro regiones electrodensas con características como para ser de valor limitado en su identifi-

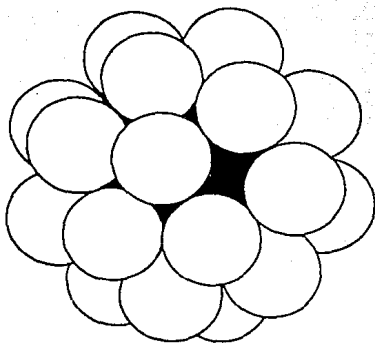


Figura 1

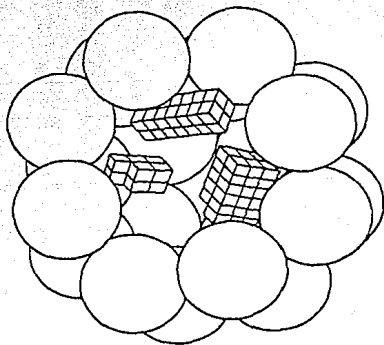


Figura 2

cación. Con ferritina pura el uso de técnicas de tinción negativas ha hecho que sea visualizada la proteína de la concha (con un diámetro externo de 12 nm).

La ferritina dentro de los tejidos, presenta una gran variedad de apariencias en el microscopio electrónico y su relación a organelos celulares y membranas posee muchas preguntas, las cuales no todas son clarificadas.

Besis y Breton-Gorius demostraron células reticuloendoteliales ricas en ferritina en el centro de islotes eritroblásticos de la médula ósea y notaron que en puntos de contacto entre los dos tipos de células, la ferritina parece ser transferida dentro de las células rojas en desarrollo por un proceso de pinocitosis que ellos llamaron "Rofeocitosis". En sujetos normales, esta ferritina se pensó, es metabolizada en la mitocondria por la incorporación de hierro dentro de la hemoglobina. Cuando hay un defecto en la síntesis de la hemoglobina como en la talasemia, el hierro de la ferritina libre es acumulado en la mitocondria.

Aunque estos autores aceptan que la mayoría del hierro para la eritropoyesis probablemente era derivada de la transferrina, no pudieron potencialmente ver que la mayoría de las células sintetizaran ferritina. Tanaka demostró que las vesículas pinocitóticas de los eritroblastos que contienen ferritina pueden coalescer antes de romperse en la superficie celular probando ésto un significado para la remoción del hierro de la célula.



Tanaka y Brecher sugirieron que la ferritina podía ser sintetizada en la superficie celular, particularmente donde había una sobrecarga del mecanismo de transporte normal debido a una alta saturación de transferrina.

En eritroblastos humanos normales la ferritina es encontrada más frecuentemente en vesículas de 0.05-0.5  $\mu$ m, las más grandes contienen varios cientos de partículas en sección cruzada. Las partículas de ferritina pueden ocasionalmente ser encontradas en vesículas lisosomales, y dispersas en el citoplasma, aunque el número de éstas es considerado reducido para el estadio en que la célula ha llegado a la edad de reticulocito.

En estados patológicos las células eritroides pueden contener masas de ferritina acumuladas en "sideromas", secundariamente lisosomas y asociadas con otras estructuras como los cuerpos de Heinz, cuerpos de mielina y ocasionalmente dentro del núcleo.

En las anemias sideroblasticas hay depósitos característicamente focales de hierro entre los espacios mitocondriales, estos depósitos varían en intensidad entre las células y entre diferentes mitocondrias en la misma célula. El depósito generalmente tiene una apariencia amorfa, pero cuando los depósitos citoplasmáticos son formados, esta apariencia amorfa o cristalina puede ser imposible de clasificar como ferritina o hemosiderina.

La capacidad de sintetizar ferritina es encontrada en una gran variedad de células que incluye corazón, riñón, páncreas, glándulas adrenales y placenta.

Trump y colaboradores han mostrado que puede estar asociada con muchas estructuras intracelulares, ellos sugieren que en condiciones de sobrecarga de hierro, la ferritina libre y la asociada a las membranas son eventualmente secuestradas en los lisosomas donde la degradación de la hemosiderina está limitada, y que estas formas son el lugar final de reposo intracelular para el exceso de hierro. Seymour ha mostrado una fragilidad aumentada de los lisosomas sobrecargadas de hierro con un aumento en su contenido de hidrolasas ácidas. Se supone que la disrupción de estos organelos pudieran resultar en el daño tisular encontrado en las enfermedades por depósito de hierro.

## SINTESIS DE LA FERRITINA.

La ferritina es inusualmente estable al calor (80°C) (1,2,3,4) y relativamente fácil de aislar de los tejidos. Ha sido largamente conocido el aumento en la concentración tisular de ferritina siguiendo a la administración de hierro. Granick mostró que después de administrar una simple dosis de hierro a un conejillo de indias, había un rápido aumento en el número de cristales de ferritina, lo cual podía ser detectado en la mucosa duodenal después del tratamiento con sulfato de cadmio. La estimulación de la síntesis de ferritina por el hierro ha sido demostrada en varias especies animales, en órganos completos, en secciones de tejido, cultivos celulares y en sistemas libres de células.

En los leucocitos de sangre periférica humana (18), ha sido demostrada una aparente baja respuesta, pero estudios individuales de monocitos, polimorfonucleares y linfocitos en forma aislada han mostrado que la síntesis de ferritina puede ser disminuida añadiendo desferroxamina a los medios de incubación en todos los casos, y que la síntesis en monocitos es estimulada por el hierro.

La administración de hierro in vivo, produce un aumento tanto en el hierro de la ferritina como en la ferritina contenida en las proteínas de los tejidos, particularmente en el hígado. Un aumento en la concentración de ferritina después de la administración de hierro, puede ser causado por la combinación del hierro administrado con la apoferritina ya presente en la célula, protegiendo la proteína contra su ruptura. Por otra parte existe evidencia in vitro de que la ferritina rica en hierro es más resistente a la degradación enzimática que la apoferritina.

Sin embargo en 1955 Fineberg y Greenberg mostraron que el hierro aceleró la síntesis de la proteína de la ferritina y muchos estudios más tarde lo han confirmado.

Tanto en órganos completos como en cultivos celulares el aumento en la síntesis de proteínas es proporcional al suplemento del hierro, aunque la sensibilidad del mecanismo y la máxima capacidad varía de tejido a tejido. Continuando sin ser bien entendido el mecanismo de la inducción del hierro.

Fineberg y Greenberg, usaron primero la ultracentrifugación para demostrar que durante la estimulación de la síntesis de ferritina por el hierro, el inicial producto parece ser la apoferritina. Esta observación fue confirmada por Drysdale y Munro usando la técnica de centrifugación de gradiente de densidad

Drysdale y cols. mostraron que la disminución del RNA hepático por desnutrición no inhibió la inducción de la síntesis de apoferritina por el hierro y ellos sugirieron que el RNA mensajero para la ferritina era muy estable ó que su uso más efectivo era disminuyendo la concentración de este RNA mensajero.

La inyección de hierro, posterior a la inyección de aminoácidos marcados redujo la velocidad de decaimiento de la proteína con C-14 y aún usando guanido arginina para minimizar la reutilización del carbono 14 se obtienen los mismos resultados. Estos mismos autores sugirieron que la administración de hierro no sólo induce la síntesis de apoferritina sino que estabiliza la ferritina que es formada por aumento en su contenido de hierro. Sin embargo Chu y Fineberg, y Millar y cols. usando diferentes métodos experimentales concluyeron que el hierro no parece "inducir" la síntesis protéica de la ferritina por estabilización de la proteína rica en hierro. Esto está de acuerdo con la relativamente baja velocidad de degradación comparada con el tiempo que toma para estimulación de su síntesis por el hierro.

La vida media de la ferritina en el hígado de la rata fue de cerca de 70 horas por Drysdale y Munro, y de 50 a 60 horas por Linder y cols., mientras la captación máxima para la leucina ocurre 5 horas después de la inyección.

Los estudios en sistemas libres de células capaces de síntesis de proteínas no han resuelto el mecanismo de inducción de hierro.

Saddy y cols estudiaron la síntesis de proteínas en un sistema libre de células preparados de hígado de rata normal y encontraron que la estimulación no resultó de la inclusión de citrato de amonio férrico (36 a 390  $\mu\text{m}/\text{l}$ ) en el medio de incubación. Sin embargo después

de la administración de hierro en vivo, la estimulación de la síntesis de ferritina puede ser demostrado en la preparación libre de células, y parece ser producido por un aumento en la velocidad de traslado, más que el número de polisomas involucrados. En contraste Drysdale y Shafritz fueron capaces de estimular la síntesis de apoferritina con hierro en sistemas libres de células de hígado de ratas y conejos, aún después de inhibir la síntesis protéica con cicloheximida.

Sugirieron que el hierro no tuvo efectos sobre la cantidad de la nuevamente sintetizada sub-unidad de apoferritina y que aumentó el número de moléculas de apoferritina completas actuando sobre la liberación de sub-unidades o por estabilización de moléculas completadas. Aunque se presentó poca evidencia para apoyar esta conclusión, Saddi y cols. encontraron que mientras hubo gran aumento en la cantidad de ferritina marcada liberada de sus fracciones polisomales, no hubo aumento en la cantidad de un marcaje que pudiera ser artificialmente liberada de los ribosomas por sonicación. Actualmente existen una variedad de métodos para estudiar la síntesis de ferritina en sistemas libres de células. De cualquier manera la síntesis de ferritina puede ser estudiada por un sistema libre de células, de reticulocitos dependientes del RNA mensajero del hígado.

Este par de técnicas con métodos para detectar las sub-unidades pueden dar la respuesta al problema de cómo el hierro estimula la síntesis de ferritina. Aunque la ferritina es considerada generalmente una proteína sintetizada en los polisomas libres para el uso interno de las células, la síntesis en los ribosomas unidos al reticuloendoplasma (RE) también ocurre.

Puro y Richter notaron que aunque las moléculas de ferritina que contienen hierro pueden ser visualizadas por microscopía electrónica en varios sitios donde las células del hígado de rata estaban sobresaturadas de hierro, la ferritina no pudo ser detectada en la cisterna del sistema reticuloendoplasmico (RE).

Ellos dedujeron que la síntesis combinada a la apoferritina por la incorporación del hierro se lleva en cualquier parte. Esta evidencia de un mecanismo secretorio para la ferritina está en relación con su presencia en la circulación y es de interés que la ferritina sérica tiene un

bajo contenido de hierro, lo que está de acuerdo con la ausencia de detectable hierro en el RE.

Recientes datos de Munro y sus Cols. sugieren que la síntesis de ferritina en los polisomas libres puede ser más sensible al hierro que en los polisomas fijos, aunque ambos responden proporcionalmente al hierro. La relativa contribución de los ribosomas unidos a la ferritina intracelular, y secretada no es conocida. Del tamaño de los polisomas que sintetizan ferritina fue demostrado que las sub-unidades formadas en los polisomas libres en respuesta al hierro tienen un peso molecular de 13,000 a 14,000 comparado a 19,000-20,000 daltons para aquellos formados en los polisomas fijos. Nitsu y cols. han encontrado subunidades de tres diferentes tamaños, ellos sugieren que aquellos de peso molecular de 10,000 a 11,000 y de 7,000 a 8,000 se agregan para formar sub-unidades de un peso molecular de cerca de 19,000 daltons.

Linder y cols. concluyen que la molécula de ferritina está compuesta de al menos dos tipos de subunidades que son hechos como cadenas polipeptídicas independientes y que la proporción de éstas varían con la carga de hierro. Aunque de esta conclusión en la variación del tamaño de las sub-unidades podría resultar su relación en el procedimiento de extracción. La existencia de diferentes moléculas en diferentes estados de sobrecarga de hierro requiere que sea demostrado.

La ferritina parece ser primariamente sintetizada en los polisomas libres dentro de la célula como sería esperado su papel como una proteína de depósito sin embargo hay evidencia de que alguna síntesis ocurre en los polisoma unidos a la membrana, los cuales son activos en la biosíntesis de proteínas que son secretadas. Esta observación puede ser particularmente reelevante a la ferritina en plasma. Pero es incierto aún, si la ferritina encontrada en el plasma es sintetizada en los polisomas unidos a la membrana o es meramente un producto del daño celular. Sin embargo, el bajo contenido de ferritina sérica aún en estados de sobrecarga de hierro y la reciente demostración de la presencia de carbohidratos en la molécula de ferritina sérica deja apoyar el concepto de que la ferritina puede ser activamente secretada.

## CAPTACION Y LIBERACION DEL HIERRO.

De acuerdo a lo que se mencionó anteriormente después de la administración de hierro, la apoferritina inicialmente formada luego acumula el hierro. Pape y cols. han sugerido un mecanismo alternativo basado sobre estudios de la química del hierro en solución acuosa. Micelas esféricas polinucleares de 7.5nm de diámetro, estables bajo condiciones fisiológicas pueden ser producidas en la presencia de agentes quelantes para formar una concha protectora alrededor de cada micela.

Estos mismos autores sugirieron que después de la formación primaria de dichas micelas con complejos de hierro de bajo peso molecular dentro de las células, las sub-unidades de apoferritina se combinan alrededor de cada micela para formar una molécula completa de ferritina. Es generalmente aceptado que la formación primaria de una concha de apoferritina es seguida por el paso del hierro a través de espacios entre las sub-unidades dentro del área central. La apoferritina ha sido desde hace mucho conocida para tomar el hierro ferroso pero no el férrico y estudios in vitro de ferroxidasa catalizando la formación de su centro de óxido férrico del hierro ferroso.

El producto ha sido identificado como parecido a la ferritina, por su apariencia bajo el microscopio electrónico y estudios de su comportamiento en la ultracentrífuga y sobre electroforesis, así como su patrón de difracción electrónica y en rayos "X".

Para explicar esta acción catalítica de la apoferritina Niederer sugirió la hipótesis de penetración. La molécula de apoferritina contiene orificios a través de los cuales el hierro ferroso puede entrar, y en la superficie interna de la concha protéica el hierro es oxidado. Los iones férricos producidos forman una micela de hidróxido férrico, el cual será tan grande como para escapar de la concha apoprotéica. Niederer propuso que los residuos de histidina sobre la proteína interna de la concha fueron los responsables en la oxidación del hierro ferroso.

Varios iones divalentes, particularmente zinc inhibieron la incorporación del hierro ferroso dentro de la ferritina y esta observación apoya la hipótesis, ya que los iones de zinc forman complejos con péptidos de histidina. Los estudios experimentales de Harrison y cols. apoyan la hipótesis de que los iones ferrosos entran en la molécula de apoferritina a través de canales entre sub-unidades donde ocurre la oxidación a férrico.

El núcleo de hidróxido férrico comienza a crecer en varios sitios en el lado interno de la proteína. Una vez que la formación de cristales ha empezado, el hierro puede ser oxidado sobre la superficie del cristal tanto que durante la fase de crecimiento el área de superficie del cristal controla la velocidad en la cual el hierro es aceptado por la ferritina. Bryce y Crickton consideraron que el mecanismo de formación de la ferritina puede ser simplemente explicado por la teoría de penetración de Niederer y ellos han hecho un sin número de críticas al trabajo de Harrison y sus colegas.

Es generalmente asumido que el hierro in vivo puede ser retirado de la ferritina para participar en otras reacciones metabólicas, pero mucha de la información acerca de la liberación del hierro de la concha protéica ha resultado de experimentos in vitro.

Pape y cols. encontraron que el hierro puede ser retirado de la ferritina a una velocidad significativamente fisiológica usando un agente quelante en ausencia de agentes reductores. Jones y Johnston encontraron que la velocidad de liberación del hierro de la ferritina no fraccionada del bazo de caballo varía directamente por la concentración de ferritina. Hoy y sus Cols. usaron fracciones de ferritina de variable contenido de hierro y mostraron que la velocidad a la cual el hierro fue liberado depende del contenido de hierro en la ferritina. El hierro fue liberado más rápidamente de la ferritina de bajo contenido de hierro.

Dos mecanismos enzimáticos para el retiro del hierro procedente de la ferritina han sido descritos. Green y Mazur sugirieron que la xantino-oxidasa catalizó la reducción del hierro férrico a ferroso. El papel de la xantina oxidasa in vivo permanece incierto. Osaki y Sirivech reportaron que el NADH y FMNH<sub>2</sub> enzima dependiente que podía retirar el hierro de la ferritina, estuvo presente en hígados de varias especies de vertebrados.

En la presencia de la parcialmente purificada enzima y el NADH, el hierro férrico en la ferritina fue reducido por un número de agentes, aunque la reducción de la riboflavina y el FMNH<sub>2</sub> fueron particularmente efectivos. Esta observación ha sido confirmada.

Sirivech y cols. han calculado que la cantidad de hierro de la ferritina reducida por la xantioxidasa fue de menos del 1% que presenta la ferritina.

## ISOFERRITINAS.

La isoferritina es un término usado para describir las ferritinas que pueden diferir en una o más proteínas.

La primera demostración de una isoferritina se debe a Richter quien demostró que la ferritina de las células neoplásicas de hígado humano tenían una movilidad electroforética mayor que la de la ferritina de varios tejidos humanos normales. Alfrey y cols. más tarde mencionaron que las isoferritinas estuvieron presentes en tejidos humanos normales. Ellos demostraron una proteína que contiene hierro de extractos de médula ósea y eritrocitos ricos en reticulocitos que tuvieron una más alta movilidad sobre la electroforesis de acetato celulosa que la ferritina de hígado y bazo.

La presencia de la isoferritina en los reticulocitos ha sido confirmada por la detección de la proteína de la ferritina con el método inmunoradiométrico en lugar del hierro marcado. En la rata, Linder-Horowitz y cols. encontraron que el corazón contiene dos ferritinas, una de las cuales tiene una movilidad electroforética mayor.

La ferritina del riñón tuvo una movilidad intermedia. Las diferencias electroforéticas entre ferritinas de diferentes tejidos, no parecen estar relacionadas a diferencias en el contenido de hierro, comportamiento en la ultracentrífuga, apariencia bajo el microscopio electrónico o en su habilidad a cristalizar. Sin embargo, diferencias en su composición de aminoácidos ya han sido reportados para la apoferritina del hepatoma y del hígado normal de rata.

El mapeo péptido de digestión trípica da más información en relación a las diferencias en



la estructura primaria entre las isoferritinas. Después de estos hallazgos, Richter y Crickton y sus colegas no aceptaron que las ferritinas normales de ciertos tejidos puedan ser distinguidas por electroforesis. Hasta la fecha ninguna isoferritina humana parece ser inmunológicamente distinguible de la ferritina humana de hígado o bazo.

Han sido descritos cambios durante el desarrollo en las propiedades de la ferritina de un órgano específico. En hígado de rata de 4 días antes de nacer a 21 días después de su nacimiento una ferritina da similar movilidad que la del riñón de rata adulta, pero después de que el hierro fue inyectado a los 21 días, la nueva ferritina formada migró con la ferritina de hígado adulto. Linder y cols. sugirieron que el hierro inducido en tipo adulto de ferritina normal sería encontrado sólo en el hígado maduro de la rata.

Cuando se enfoca desde el punto de vista isoeléctrico se han descrito otras formas heterogéneas de moléculas de ferritina.

Esta microheterogeneidad de un órgano sencillo ha sido demostrado en gradientes de sucrosa en ferritina de hígado de rata normal, ferritina de bazo de caballo, ferritina hepática de conejo, y en ferritinas de hígado y bazo humanos normales. Las bandas de isoferritinas encontradas después de electrofocus en gel parece ser característica de tejidos en particular y algunas bandas son comunes a todos los tejidos estudiados. En situaciones como malignidad o hemocromatosis se han visto cambios del patrón normal, estos cambios en general están de acuerdo con los encontrados en electroforesis en gel con policrilamida. Hay poca duda que con adecuadas técnicas experimentales la heterogeneidad ha sido ya demostrada, pero aún no se conoce el porqué ocurre este fenómeno, aunque se ha sugerido que podría resultar de varias proporciones de diferentes subunidades entre las isoferritinas. Pero también la heterogeneidad puede resultar de la variedad de tipos de células dentro de un simple tejido, las cuales pueden proveer diferentes ferritinas.

Las isoferritinas aisladas de diferentes tejidos pueden diferir del contenido de hierro y en su respuesta al mismo. Powell y cols. han encontrado que los componentes ácidos de la ferritina de corazón humano fueron ricos en hierro, mientras los componentes "normales" contienen poco hierro. La ferritina pancreática parece casi no tener hierro. Linder y Munro

encontraron que las ferritinas de corazón, diafragma, y el músculo del muslo contenían aproximadamente iguales cantidades de hierro. La ferritina de los eritroblastos de los conejos es menor comparada con la del hígado y la del bazo. En el caso de tumores hepáticos la cantidad del contenido del hierro en la ferritina fue relacionada al tiempo de duplicación del tumor. Aunque el hierro estimula la síntesis de la proteína de la ferritina en todos los tumores el radio hierro/ferritina disminuye con la velocidad del crecimiento del tumor. Sin la estimulación por la administración de hierro, el contenido protéico de la ferritina de el tumor también tendió a disminuir cuando la velocidad de crecimiento del tumor aumentó. Ha sido mencionado también un bajo contenido de hierro en la ferritina de los leucocitos humanos, los cuales contienen un amplio rango de isoferritinas y concentración de ferritina que puede ser subestimadas (13). Los monocitos contienen más ferritina que los linfocitos y polimorfonucleares.

## FERRITINA CIRCULANTE.

En el pasado se consideraba a la ferritina como una proteína intracelular y ha sido identificada en secciones histológicas o en frotis de médula ósea junto con su derivado insoluble la hemosiderina por el color azul obtenido mediante la reacción de Azul de prusia. Se consideraba que la ferritina sólo podía encontrarse en el suero en estados patológicos como el daño hepático cuando se liberaba de las células necróticas. Sin embargo el desarrollo de nuevas y más sensitivas técnicas han demostrado que la ferritina normalmente se encuentra en el suero y en las células sanguíneas circulantes. La capacidad de medición de las concentraciones séricas de la ferritina han hecho posible relacionar los resultados a un mejor conocimiento en la estructura y función de la ferritina por un lado y a una variedad de entidades clínicas por el otro, aportando así una herramienta en la investigación del metabolismo del hierro en pacientes con una variedad de enfermedades (2,3,4,6,7,8,19,20)

# II

## FACTORES QUE AFECTAN LOS NIVELES DE LA FERRITINA SERICA

**E**l papel fisiológico y original de la ferritina aún es desconocido. Debido a las bajas concentraciones de ferritina encontradas en el suero normal, la mayoría de los estudios de su molécula ha sido realizada en sueros de pacientes con sobrecarga de hierro y las características de estos pacientes han sido estudiados con detalle. Parece que aún en la sobrecarga de hierro hay poco contenido de hierro en la ferritina sérica comparada con las ferritinas tisulares sin embargo hay un aumento en las isoferritinas básicas comparadas con el perfil de isoferritinas del suero de sujetos normales. La vida media de todas las ferritinas es muy corta (de la orden de 10 min.) pero la vida media de la ferritina sérica es significativamente mayor que la de algunas ferritinas tisulares.

Los métodos comunmente usados para la demostración de los excesivos depósitos de hierro incluyen:

1) Medición de la concentración del hierro sérico,

- 2) Medición del porcentaje de saturación de la transferrina plasmática,
- 3) Estimación de los depósitos quelatables usando agentes como la dexferroxamina,
- 4) La medición de la concentración de ferritina sérica,
- 5) Biopsia de hígado con determinaciones histológicas o químicas de la concentración de hierro tisular,
- 6) Aspiración de la médula ósea con tinción histoquímica y la
- 7) Flebotomía cuantitativa.

Cada método tiene sus inherentes ventajas y limitaciones. Los niveles de hierro sérico están sujetos a considerables variaciones. Mientras los niveles del hierro sérico y el porcentaje de saturación de la transferrina están elevados en el curso temprano de la enfermedad con sobrecarga de hierro, una elevación no es necesariamente indicativa de sobrecarga de hierro. Como sucede en el paciente con enfermedad hepática alcohólica donde la concentración de hierro en plasma está elevada sin sobrecarga de hierro, esto puede ayudar a diferenciar a la cirrosis alcohólica de la hemocromatosis idiopática. La flebotomía cuantitativa hasta el nivel de crear deficiencia de hierro y anemia provee sólo una estimación retrospectiva. El método más comunmente usado para determinar los depósitos de hierro en el sistema reticuloendotelial, es la estimación de la cantidad de hierro presente en el aspirado de médula ósea, pero éste es un procedimiento invasivo sólo semicuantitativo con una relativamente pobre reproductibilidad. El método más satisfactorio para medir los depósitos de hierro movilizables, es la flebotomía cuantitativa hasta llegar a la deficiencia de hierro y anemia, aunque es sensible, no es práctico.

El descubrimiento de que la determinación de la ferritina sérica refleja los depósitos de hierro corporal total ha hecho posible que un método sencillo, simple y efectivo sea accesible a la evaluación del hierro corporal total. En adultos sanos la concentración de ferritina en suero, ha mostrado ser directamente relacionado a la cantidad de hierro

accesible de los depósitos del cuerpo y a los cambios en el hierro del sistema del reticuloendotelio por modificaciones en la concentración de la ferritina sérica. La media de una concentración más elevada en los hombres que en la mujer, indican o reflejan un mayor depósito de hierro en los hombres, generalmente aceptado en todas partes entre 20 y 200 ng/mL. y en mujeres entre 10y 150 ng/mL. En pacientes con deficiencia de hierro la concentración de ferritina sérica se encuentra por abajo de 10 ng/mL. y en pacientes con sobrecarga de hierro puede aumentar a niveles de 1000 ng/mL. o más.

Cambios en el hierro del sistema reticuloendotelial, son rápidamente seguidos por cambios en la concentración de la ferritina sérica, sin embargo, muchos pacientes en quienes no es detectada la presencia de hierro en la médula ósea por la tinción de azul de prusia pueden tener niveles normales circulantes de ferritina.

## **CAMBIOS RELACIONADOS AL SEXO Y A LA EDAD.**

Los niveles de la ferritina sérica en los diferentes grupos de edad ha sido estudiada por un gran número de investigadores (21,22,23,24,25,26,27,28,29). Se ha demostrado (30) que existen cambios de su concentración durante el período neonatal y durante la infancia. La concentración media de la ferritina circulante en la sangre del cordón umbilical es semejante a la encontrada en el adulto normal. De la edad de 6 meses a la pubertad, la ferritina sérica permanece relativamente constante con una concentración media de aproximadamente 30ng/mL.(los niveles más bajos encontrados), después de esto la concentración de la ferritina sérica aumenta a aproximadamente 40 ng/mL. en la mujer adulta y a 140 ng/mL. en el varón adulto, aunque otros autores han dado una media más baja (21). Los niveles son generalmente más elevados en el hombre que en la mujer en edad reproductiva y refleja las diferencias conocidas en los niveles de hierro de depósito en el varón adulto, pero las concentraciones son más elevadas en las mujeres añosas que en las jóvenes, esto probablemente nos refleje el incremento en los niveles del hierro de depósito, lo cual se ve al cesar la menstruación por arriba de 45 años, aproximándose la concentración media de ferritina sérica a la del varón adulto.

Las concentraciones de ferritina sérica cíclica o diurna son menos variables que las concentraciones del hierro sérico

## **ANEMIA POR DEFICIENCIA DE HIERRO.**

Los pacientes con una simple deficiencia de hierro tienen una concentración de ferritina sérica de menos de 12 ng/mL. (31) Si la deficiencia está asociada a otras condiciones como la inflamación o infección, las concentraciones son bajas aunque no necesariamente menores a 15 ng/mL. (ver más adelante). Se ha reportado que la determinación de la ferritina sérica y del porcentaje de saturación de la transferrina han sido de gran ayuda para separar a niños con significativa deficiencia de hierro de aquéllos cuyos depósitos de hierro son suficientes para mantener una hemoglobina dentro de límites normales. El medir la concentración de ferritina sérica también puede ser de invaluable ayuda para detectar una latente deficiencia de hierro en la población geriátrica hospitalizada.

## **EMBARAZO.**

Durante el embarazo la concentración de ferritina sérica disminuye. Después de la 35a. semana del embarazo las concentraciones son más bajas en mujeres que no han recibido feroterapia en comparación con quienes lo han hecho. Se ha estimado que existe una caída profunda de aproximadamente 30 a 40 ng/mL durante el embarazo. Esta caída en etapa temprana es probablemente debida a un aumento en la actividad eritroide materna, pero en la segunda mitad del embarazo la disminución en la concentración de la ferritina sérica refleja la transferencia del hierro al feto. Por otra parte no existe correlación entre las determinaciones de la ferritina sérica de la madre y la sangre del cordón puesto que la determinación en este último indican que la concentración en el feto no difiere significativamente entre fetos de madres que reciban o no apoyo con hierro suplementario(32,33).

## TERAPIA CON HIERRO.

Los niveles de ferritina sérica han sido utilizados para monitorear el tratamiento con hierro, y éste ha sugerido el que se continúe por al menos 3 meses más después de que se ha normalizado la hemoglobina para así obtener un llenado de los depósitos del mismo. Durante el período de regeneración de la hemoglobina los niveles de ferritina y hierro sérico caen otra vez, alcanzando los niveles más bajos la ferritina cuando los depósitos de hierro se agotan. Después de la administración de hierro parenteral los niveles de la ferritina sérica se mantienen elevados durante aproximadamente 3 semanas, reflejando probablemente la inducción de la síntesis de ferritina por el hierro, considerándose así mismo el permitir este período de tiempo para obtener una estabilización de sus niveles séricos y otra vez reflejar adecuadamente los depósitos del hierro. En estos paciente bajo tratamiento con grandes dosis de hierro oral debe de interpretarse con precaución los valores de la ferritina, tomando especial cuidado que el aumento de la ferritina sea sostenido al suspender el tratamiento.

## INFECCION, INFLAMACION Y ENFERMEDAD CRONICA.

La evaluación de los depósitos de hierro en la enfermedad crónica especialmente en estados inflamatorios crónicos es un problema de una particular dificultad (5,11,34,35). La anemia de la enfermedad crónica es descrita como una anemia normocítica o hipocrómica, asociada a baja concentración de hierro sérico y un aumentado depósito de hierro en las células endoteliales. En estas condiciones el hierro sérico no es un índice válido de deficiencia de hierro. El hierro es transferido de la transferrina y del compartimiento eritroide al pool de depósito reflejándose ésto en un aumento de la concentración sérica de la ferritina. El hierro puede estar bajo pero la presencia de una ferritina sérica normal nos da una indicación de que los depósitos de hierro no están depletados. La inflamación y la infección aguda provocan una caída rápida en la concentración del hierro sérico y un aumento en la concentración de la ferritina sérica. Muchos pacientes con inflamación crónica, infección o enfermedad maligna con anemia también tienen una baja concentra-

ción del hierro sérico con cantidades normales o aumentadas del hierro teñible en la médula ósea. La ferritina sérica parece ser más elevada a medida que es mayor la cantidad de hierro teñible en estos pacientes que entre los que no muestran infección o inflamación. Los que no muestran hierro en la médula ósea pueden tener concentraciones hasta de 50 a 100 ng/mL. en lugar de menos de 15 ng/mL. quees lo que se observa en los pacientes con anemia hipoferrémica simple. Los cambios recíprocos en los niveles plasmáticos del hierro y la ferritina parecen reflejar la alteración de la célula del reticuloendotelio para procesar el hierro, restringiendo su liberación y tendiendo a una disminución de la concentración sérica del mismo, con un concomitante aumento en la síntesis de ferritina, lo cual puede continuar por largos períodos de tiempo.

En estados inflamatorios (febriles o infecciosos) la concentración de la ferritina sérica puede no directamente reflejar los depósitos de hierro corporales, por lo que debe de repetirse la determinación de la ferritina sérica 2 a 3 semanas después de que la fiebre o la infección haya desaparecido para que pueda dar una más adecuada estimación de los depósitos de hierro corporal.

También la determinación de la ferritina sérica puede ser usada para conocer el estado del hierro en los pacientes con artritis reumatoide ya que una concentración de ferritina sérica menor de 12 ng/mL es una clara indicación para el tratamiento con hierro, mientras que las concentraciones en el rango normal excluirán una deficiencia de hierro como factor contribuyente de la anemia, por otra parte concentraciones mayores a 200 ng/mL indicarán adecuadas reservas en el sistema reticuloendotelial y son una contraindicación para la terapia con hierro.

En la poliartritis juvenil crónica la medición de la ferritina sérica está más relacionada con la actividad de la enfermedad más que con los depósitos de hierro, ya que fluctuaciones en ella reflejan actividad de la enfermedad, sugiriendo que puede ser una guía de mucha ayuda para el manejo de estos niños.

Otras situaciones clínicas en las cuales el hierro sérico no refleja adecuadamente los depósitos de hierro se presenta en los pacientes con anemia megaloblastica no tratada,



como por ejemplo en la anemia perniciosa. En dichas condiciones el hierro no es incorporado dentro de la hemoglobina debido al defecto en la maduración eritroide que existe, mostrando una baja hemoglobina, y niveles de hierro elevados en presencia de depósitos aumentados de hierro medular. Posterior al tratamiento con vitamina B-12 el hierro de la médula es movilizado mostrando algunos pacientes ser deficientes en hierro.

## DIALISIS RENAL.

Aquí también la determinación de la ferritina sérica es de mucha importancia, ya que el valorar los depósitos de hierro en los pacientes con insuficiencia renal crónica ha sido difícil utilizando criterios que incluyen la determinación del hierro sérico, la capacidad de captación de la transferrina y los índices eritroides. La deficiencia de hierro en el paciente bajo hemodialis (11,36,37) es muy frecuente y puede resultar de la pérdida de pequeñas cantidades de sangre asociadas al tratamiento, pudiendo ésto complicar una anemia ya existente que resulte de disminución de los niveles de eritropoyetina, por lo que la ferritina sérica es un índice que refleja el estado del hierro corporal en pacientes con este problema antes y después del tratamiento con diálisis, pudiendo además así detectar un aumento en los depósitos de hierro corporales siguiendo al gran número de transfusiones en estos pacientes. La insuficiencia renal crónica per se no parece afectar las concentraciones de la ferritina sérica.

## CANCER.

Hay una particularmente alta incidencia de una elevada concentración de ferritina entre pacientes con carcinoma pancreático, cáncer de pulmón y en hepatoma (5,11,38). En la mayoría de los casos de carcinoma de esófago, estómago, colon, y malignidad urogenital, la concentración de ferritina sérica está en límites normales. Los niveles también están generalmente elevados en el cáncer de mama avanzado con enfermedad metastásica, sin embargo esta prueba ha probado tener muy poco valor en la predicción de el desarrollo de enfermedad metastásica (39). Pacientes con leucemia aguda no tratados generalmente tienen una concentración de ferritina sérica elevada, particularmente en la leucemia

mielomonocítica (M-4). Los niveles son bajos en Leucemia mielógena crónica. El efecto de la quimioterapia sobre los niveles de la ferritina sérica parece ser muy variable. En leucemia mieloblastica aguda se ha encontrado un ligero aumento en la concentración de ferritina sérica cuando las muestras se tomaron después de que habían obtenido remisión hematológica completa comparada con la concentración de ferritina al momento de su presentación. En niños con leucemia linfoblastica aguda encontraron que los niveles de ferritina estaban aumentadas al momento de presentación, posteriormente muy elevadas cuando el paciente recibía quimioterapia y en completa remisión pero disminuyeron a los límites normales cuando los niños estaban en remisión pero no recibían ya quimioterapia, pero otros autores encontraron que la concentración de ferritina sérica en niños que reciben quimioterapia y en remisión son más bajas que el valor medio a su presentación. No ha sido determinado que un aumento en la concentración de la ferritina sérica pueda preceder a una recaída hematológica.

La enfermedad de Hodgkin, desde hace mucho tiempo se ha relacionado a niveles elevados de ferritina. Estos altos niveles son vistos principalmente en pacientes con enfermedad activa que involucra el hígado y se ha relacionado también al estadio de la enfermedad (de I a IV), pero no se ha relacionado al tipo histológico.

En los linfomas la mayor cantidad de ferritina se ha relacionado al linfoma histiocítico activo y el más bajo al linfoma linfocítico con valores intermedios en el linfoma con histología mixta.

La elevación en las concentraciones de la ferritina sérica observados en asociación con malignidad pueden ser debidos a (5):

1.- La malignidad al igual que la inflamación puede causar anemia y acumulación de hierro en las células del sistema reticuloendotelial.

2.- La necrosis tisular tiende a una directa liberación de ferritina causando ferritinemia. Esto puede también ser consecuencia de la radio o de la quimioterapia.

3.- Estudios experimentales han demostrado que la ferritina es removida de la circulación por células del parénquima hepático Si la función a este nivel está afectada puede

haber una reducción en la velocidad de aclaramiento y con ello un aumento en los niveles de la ferritina sérica.

4.- Puede haber anormalidades tanto cuantitativas como cualitativas en la síntesis de ferritina en las células malignas.

## ENFERMEDAD HEPATICA CRONICA.

Ya que el hígado contiene una tercera parte de todos los depósitos de hierro corporales es de esperarse tener niveles de ferritina muy elevados en pacientes con enfermedad hepática (5). Los más altos niveles son encontrados en pacientes con masiva necrosis hepática y los moderados en pacientes con cirrosis alcohólica. Así mismo, la reducción de la concentración de ferritina sérica se correlaciona a la disminución de la actividad de la transaminasa en paciente con recuperación de una hepatitis viral o inducida por drogas. Sugiriendo que existe una relación entre estos dos parámetros para valorar sobrecarga de hierro en pacientes con enfermedad hepática. El reconocimiento de que el daño hepático por sí solo puede ser responsable del aumento de los niveles del hierro es de importancia práctica ya que estos aumentos no necesariamente están relacionados a depósitos de hierro aumentados y la alza en la concentración de ferritina puede ser el aviso de que vendrá la enfermedad hepática. En esta situación es de ayuda el repetir la determinación de la ferritina sérica cuando la enfermedad hepática activa se ha resuelto para que de esta manera sea adecuado el resultado con el reflejo de los depósitos de hierro esperados (5,11).

## HEMOCROMATOSIS.

La hemocromatosis resulta de una enfermedad del metabolismo del hierro determinada genéticamente (11). Se caracteriza por un progresivo depósito de hierro en las células del parénquima hepático y de otros órganos con eventual fibrosis y falla orgánica. Una detección temprana de la enfermedad puede tender a tratamiento oportuno y de esta manera prolongar la vida, así como prevenir o retardar irreversibles complicaciones como la cirrosis, hepatoma maligno y atrofia gonadal.

El uso de la determinación de la ferritina sérica para conocer los depósitos de hierro ha sido ampliamente usada en estos pacientes una vez que ya se ha establecido la enfermedad, con concentraciones tan marcadamente elevadas como niveles mayores a 1000 ng/mL. Así mismo el encontrar miembros afectados de la misma familia es de gran importancia ya que el diagnóstico de la enfermedad en sus etapas tempranas permitirá la intervención con flebotomías y la prevención de cantidades de hierro en exceso con su concomitante daño tisular y finalmente cirrosis. El incremento en la ferritina sérica se ha encontrado hasta en el 98% de los familiares con depósitos de hierro elevados. La combinación del hierro sérico, el índice de saturación de la transferrina y la determinación de la ferritina sérica provee una gran ayuda para estimar los depósitos de hierro corporales en la hemocromatosis precirrótica y es el más práctico esquema para la familia, evitando procedimientos peligrosos y agresivos como es la biopsia hepática.

## CIRUGIA GASTRICA.

La anemia por deficiencia de hierro es el hallazgo más común después de cirugía gástrica (11). La incidencia de deficiencia de hierro es mayor en cirugías gástricas que hacen puente al duodeno y menores cuando no hubo resección o puenteo. La deficiencia de hierro se encontró hasta en el 50% de los pacientes con resección gástrica combinada con gastroyeyunostomía en comparación con el 17% de los pacientes con una gastroduodenostomía y ninguno con pilorplastía. La diferencia puede ser explicada en parte por un defecto en la absorción del hierro de la dieta provocada por la resección y puenteo al duodeno. La determinación de la ferritina sérica es un importante marcador para monitorear el hierro corporal de estos pacientes y evitar las complicaciones crónicas inherente a la deficiencia del metal posterior a cirugías gástricas.

# III

## CONCENTRACION DE LA FERRITINA SERICA ENTRE DONADORES DE SANGRE.

- 1.- REMUNERADOS, DE ACUERDO AL NUMERO DE DONACIONES REALIZADAS.
- 2.- REMUNERADOS Y VOLUNTARIOS DE PRIMERA VEZ.
- 3.- DONADORAS VOLUNTARIAS DE PRIMERA VEZ.

### OBJETIVO:

EVALUAR LOS DEPOSITOS DE HIERRO MEDIANTE LA DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE LA FERRITINA SERICA EN DONADORES DE SANGRE REMUNERADOS Y VOLUNTARIOS.

### MATERIAL BIOLOGICO

El estudio se realizó en el Centro Hematológico de la ciudad de Tijuana B.C., de la siguiente manera:

---

## **PARTE I.**

Donadores del sexo masculino remunerados (n=148). Los cuales se dividieron a su vez en 4 grupos de acuerdo al número de donaciones y al valor de su hematócrito.

**Grupo 1 (n=32) primera donación.**

**Grupo 2 (n=43) de dos a cinco donaciones y,**

**Grupo 3 (n=40) de seis o más, todos con hematócrito mayor a 40%**

**Grupo 4 (n=33) sin importar el número de donaciones, todos con hematócrito menor al 40%.**

Al prohibirse la remuneración de la donación sanguínea en México (40) medimos la concentración de la ferritina sérica de los donadores voluntarios para conocer sus reservas de hierro de la siguiente manera:

## **PARTE II.**

Donadores masculinos voluntarios (n=59) no remunerados con hematócrito y hemoglobina normales en su primera donación.

## **PARTE III.**

Donadoras femeninas voluntarias (n=105) no remuneradas con hematócrito y hemoglobina normales en su primera donación.

Se realizaron los estudios clínicos y de laboratorio obligatorios por la Ley General de Salud (42):

- 1.- Hemoglobina
- 2.- Hematócrito
- 3.- VDRL o RPR
- 4.- Anticuerpo anti-brucela.
- 5.- AsHB (antígeno de superficie para el virus de la hepatitis B).
- 6.- Anti-VIH (anticuerpo contra el Virus causante de la Inmunodeficiencia Humana).
- 7.- Grupo sanguíneo ABO y del sistema Rh.
- 8.- La determinación de la ferritina sérica se realizó por el método de ELISA (Ferrizyme, Abbott).

Los sujetos en estudio fueron clasificados para determinar sus depósitos de hierro dentro de los siguientes rangos: (31)

Grupo I Deficientes de hierro: 0 a 12 ng/mL.

Grupo II Cifras límites: 12.01 a 10 ng/mL.

Grupo III Normales: 20.01 a 400 ng/mL.

## **PRINCIPIOS DE LA PRUEBA (Ferrizyme ABBOTT).**

Ferrizyme (ABBOTT) (43) es una prueba de inmunoensayo de fase sólida basado en el sistema de sandwich . La especificidad de esta prueba fue determinada estudiando la interferencia de la transferrina, gamaglobulinas, bilirrubinas, triglicéridos y hemoglobina,

no encontrando una significativa interferencia en los niveles de las pruebas de rutina. Con una sensibilidad del 95% de límite de confianza (2SD) al punto cero ng/mL. La sensibilidad media ha sido determinada en 0.84 ng/mL. Las muestras (patrones conocidos y especímenes desconocidos) son incubadas con perlas cubiertas con un anticuerpo antiferritina (Ac-AF) derivado de carnero y con un conjugado de anti-ferritina (derivados de conejo) con peroxidasa derivada del rábano (Ac-AF:POR). La ferritina presente en la muestra se une al anticuerpo antiferritina que se encuentra cubriendo las perlas. Luego el anticuerpo antiferritina con peroxidasa derivada del rábano reacciona con el complejo antígeno-anticuerpo (ac-AF.F) unido a las esferas. El material que no está unido es removido lavando las esferas. Estas son luego incubadas con o-Fenilenediamina (OPD), una solución sustrato que contiene peróxido de hidrógeno. Se desarrolla color con la reacción y su intensidad (proporcional a la cantidad de ferritina en la muestra) se mide usando un espectrofotómetro a 492 nm.

) - Ac-AF + F + Ac-AF:POR  $\longrightarrow$  ) Ac-AF.F.Ac-AF:POR

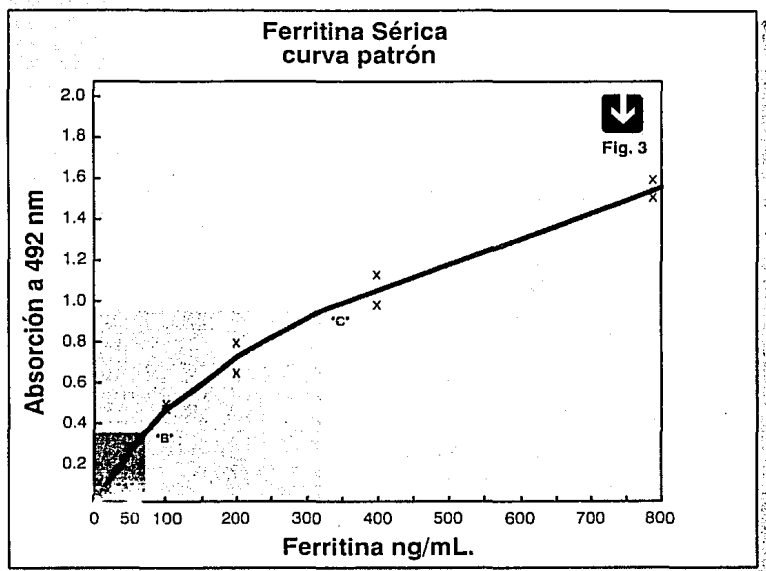
) - Ac-AF.F.Ac-AF:POR—OPD/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>— $\longrightarrow$  Color amarillo naranja

Se obtiene una curva patrón dividiendo la absorbancia (ejes Y) versus la correspondiente concentración de los sueros normales (ejes X). La concentración de las ferritinas desconocidas son corridas en forma conjuntas con las normales, y pueden ser determinadas de la curva patrón. (fig. 3)

## TOMA DE LA MUESTRA.

Las muestras de sangre en estudio fueron tomadas en tubos de vidrio sin anticoagulante en forma antiséptica, separando el plasma, evitando la hemólisis y sin agregar aditivos o preservativos. Fueron congeladas y sólo descongeladas para realizar la determinación de la ferritina sérica.





## EQUIPO.

- 1.- Pipetas de precisión de 25 uL, 300 uL y de 1 mL
- 2.- Analizador Quantum II (espectrofotómetro)
- 3.- Agitador-rotador (rotador clínico) con movimiento circular
- 4.- Pentawash II (equipo de lavado y de aspiración)
- 5.- Acido sulfúrico 1 N, No 7212

- 6.- Agua destilada
- 7.- Esferas cubiertas con Anticuerpos anti-ferritina (cordero)
- 8.- Conjugado Anticuerpo anti-ferritina:peroxidasa en un amortiguador protéico estabilizado
- 9.- Patrones de ferritina normales humanos (derivados de bazo) de 10, 50, 100, 200, 400 y 800 ng/mL en solución salina fosfatada con estabilizador protéico.
- 10.- Amortiguador de solución salina fosfatada con estabilizador protéico.
- 11.- Tabletas de OPD (o-Phenilenediamina.2HCl)
- 12.- Diluyente para el OPD (amortiguador de fosfato-citrato que contiene 0.02% de peróxido de hidrógeno).

## PROCEDIMIENTO.

- 1.- Se pipetearon 25 uL. de ladilución amortiguadora (patrón cero) así como los restantes 6 patrones (10, 50, 100, 200, 400 y 800 ng/mL.) y las muestras de estudio en las pequeñas cubetas de plástico.
- 2.- Se añadieron 300 uL. del conjugado anti-ferritina (Ac-AF de conejo):Peroxidasa (derivado de rábano) dentro de cada muestra.
- 3.- Se añadieron una esfera a cada cubeta
- 4.- Se incubaron 60 min. a temperatura ambiente (15 a 30 GC) y se mantuvieron bajo rotación de 180 +/- 10 rpm.
- 5.- Se lavaron 3 veces cada esfera con 4 a 6 mL de agua destilada

- 6.- Inmediatamente se transfirieron las esferas a tubos limpios de plástico.
- 7.- Se agregaron 300 uL. de la solución de sustrato OPD en cada tubo y en dos tubos vacíos (diluyentes blancos) sin que se agitaran o mezclaran.
- 8.- Nuevamente se incubaron cubiertos y a temperatura ambiente durante 30 minutos sin agitarse o rotarse.
- 9.- Se agregó 1.0 mL. de ácido sulfúrico al 1 Normal a cada tubo.
- 10.- Usando el diluyente blanco (punto 7) se calibró el espectrofotómetro y
- 11.- se determinó la absorbancia en 492 nm. en el equipo Quantum II para leer cada muestra.

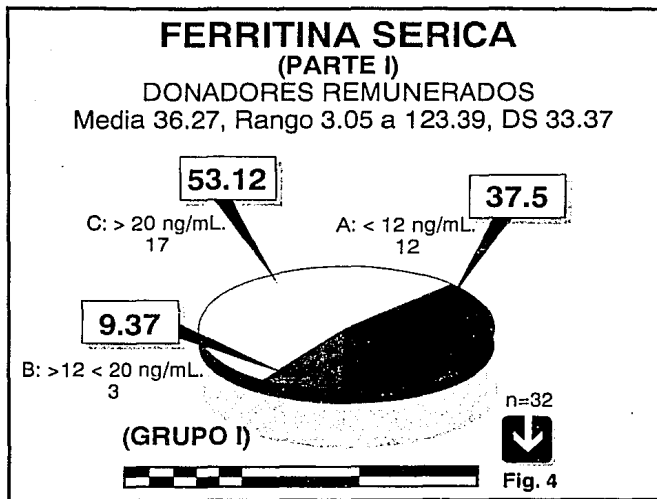
## RESULTADOS.

### PARTE I.

Dentro del Grupo de donadores de sangre "Remunerados" (n=148), todos del sexo masculino se obtuvieron los siguientes resultados:

#### Grupo I:

- a.- 37.5% (n=12)
- b.- 9.37% (n=3)
- c.- 53.12% (n=17)



De este grupo (n=32) la media es de 36.27 y la desviación Standard de 33.37 con el rango de 3.05 a 123.39 ng/mL. (fig. 4)

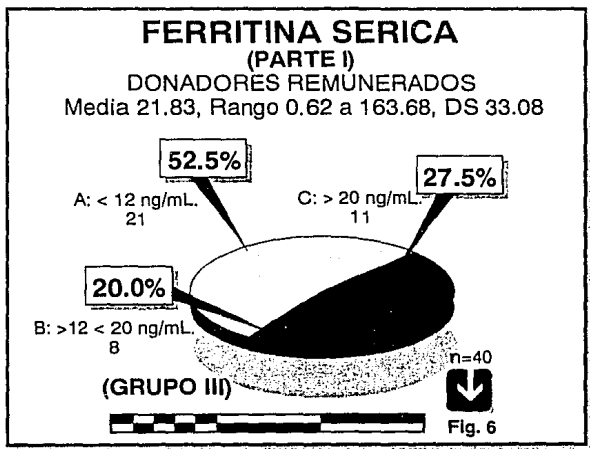
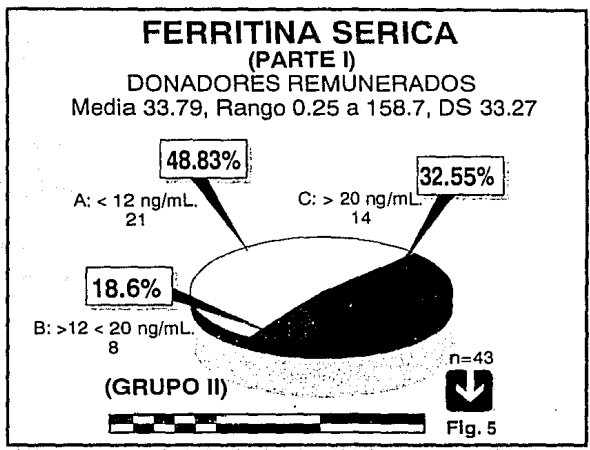
#### Grupo II:

a.- 48.83% (n=21)

b.- 18.60% (n=8)

c.- 32.55% (n=14)

En este grupo (n=43), la media es de 36.27 y la desviación standar de 33.79 con el rango de 0.25 a 158.7 ng/mL. (fig. 5)



**Grupo III:**

a.- 52.5% (n=21)

b.- 20% (n=8)

c.- 27.5% (n=11)

Aquí (n=40), la media es de 21.83 y la desviación standar de 33.08 con un rango de 0.62 a 163.68 ng/mL. (fig. 6)

**y enel Grupo IV:**

a.- 45.45% (n=15)

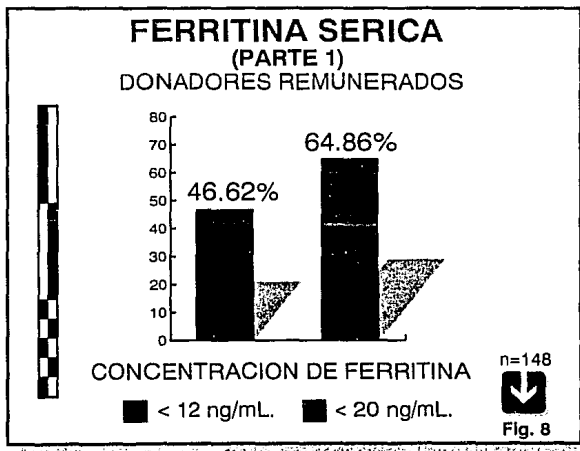
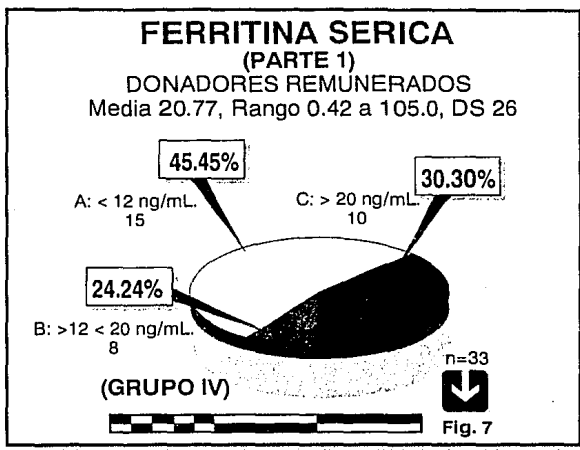
b.- 24.24%

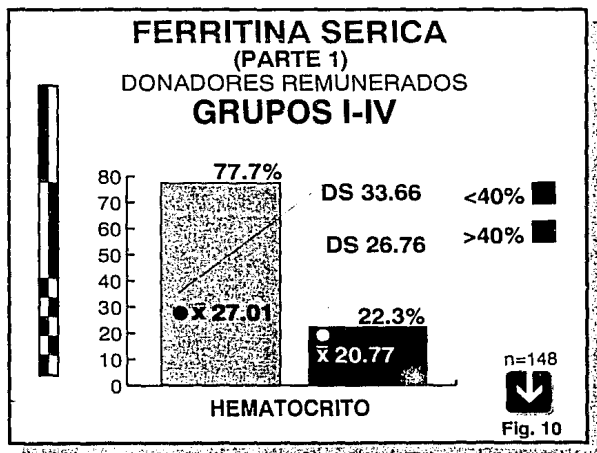
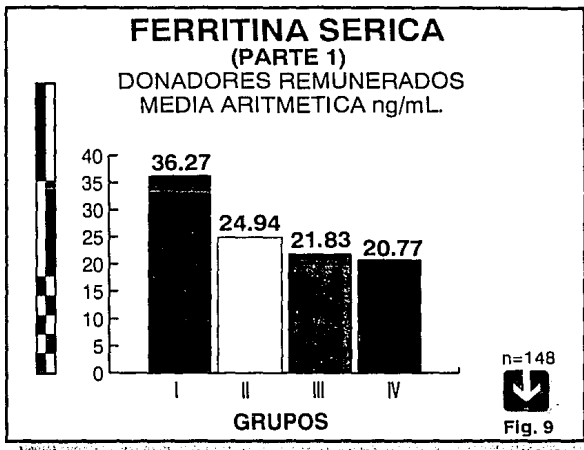
c.- 30.3% (n=10)

una media de 20.77, un rango de 0.42 a 105 y una media de 20.77 (fig. 7)

Al analizar los datos de todos los 148 donadores remunerados estudiados encontramos que el 46.62% mostraron una concentración de ferritina menor de 12 ng/mL., lo que indica que esta población es deficiente de hierro. Si tomamos en cuenta las determinaciones de ferritina menores a 20 ng/mL., considerada como cifra límite, nos encontramos con un porcentaje de 64.86% (n=96) (fig. 8).

La media aritmética del nivel de ferritina en el Grupo I fue de 36.27 ng/mL., Grupo II de 24.94 ng/mL., Grupo III de 21.83 ng/mL. y el Grupo IV de 20.77 ng/mL con una desviación patrón de 33 excepto para el grupo IV donde fue de 26. Al comparar los 4 grupos mediante la F de Fisher se obtuvo una  $p > 0.05$  (fig. 9)







Los valores de la ferritina sérica entre todos los donadores con hematocrito mayor del 40% (n=115) tuvo una media de 27.01 ng/mL. y unadesviación standar del 33.66 y entre los donadores rechazados con hematocrito menor del 40% sin importar el número de donaciones previas (n=33) se encontró una media de 20.77 y una desviación standar de 26.76 ng/mL. (fig. 10) Por lo que entre este grupo de donadores "Remunerados" aún con cifras normales de hemoglobina y hematocrito el 48.7% tuvieron cifras menores de 20 ng/mL. (fig.11)

## PARTE II.

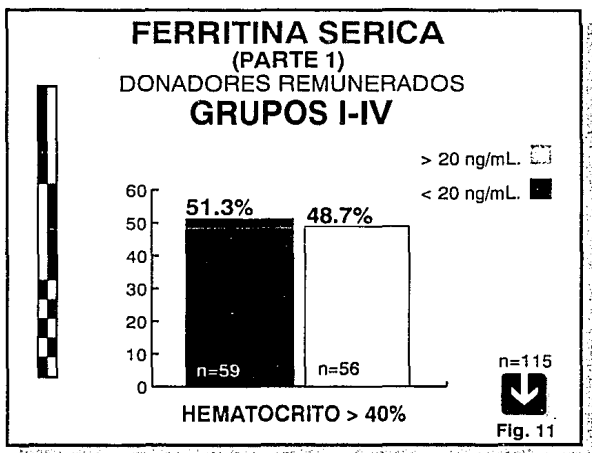
El 100% (n=59) de los donadores masculinos No remunerados de primera vez mostraron una determinación de ferritina sérica de > 20ng/mL, con un rango de 20.06 a 270.63 ng/mL, una media aritmética de 73.59 ng/mL y una desviación standar de 47.86 (fig. 12).

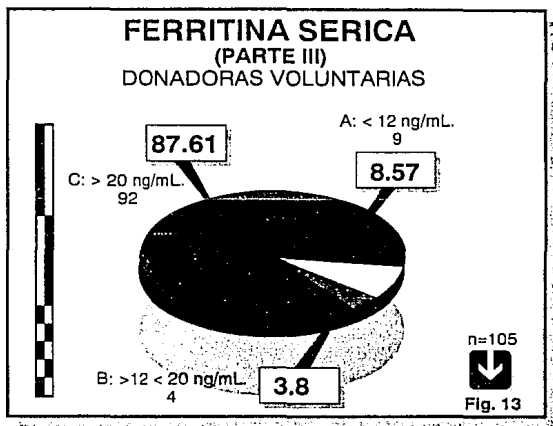
## PARTE III.

Del número total estudiado en esta parte (n=105), el 8.57% (n=9) se encontraron en el Grupo I, con un rango de 2.66 a 11 ng/mL., una media aritmética de 7.72 ng/mL y una desviación standar de 3.13; otro 3.80% (n=4) se encontró en el Grupo II con un rango de 12a17 ng/mL. con una media aritmética de 14.89 ng/mL. y una desviación standar de 4.0 El restante 87.61% (n=92) constituyó el Grupo III con un rango de 20.58 a 647.25 ng/mL., una media aritmética de 136.68 ng/mL. y una desviación standar de 17.53 (fig. 13).

## COMENTARIO.

Los niveles de ferritina sérica en donadores de sangre son significativamente menores que en aquéllos sujetos que no lo son tanto en hombres como en mujeres (44). La diferencia entre donadores en los niveles de la concentración de ferritina sérica está estrechamente relacionada a la frecuencia de donaciones en los años previos pero no en el número total de donaciones. Se ha encontrado que las cifras de ferritina entre donadores masculinos quienes no habían dado sangre fue aproximadamente dos veces mayor que la de los





donadores regulares (45). En donadores masculinos quienes han dado sangre al menos 4 veces por año la ferritina sérica después de 6 a 8 donaciones fue de 40% por abajo de la cifra de inicio. La flebotomía de 470 mL. ("una pinta") representala perdida de 230-250 mg. de hierro en el hombre y de 210 mg. en la mujer. (53) En donaciones individuales de una unidad por año ésto resulta en un aumento de los requerimientos diarios de hierro de 0.5 a 0.65 mg/día en el hombre y de 0.58 mg/día en la mujer en adición a los requerimientos basales o pérdidas basales de 0.9 mg/día en el varón adulto y de 1.3 mg/día en la mujer premenopausica. Se ha sugerido que los niveles de ferritina sérica son directamente proporcionales a los depósitos corporales totales de hierro en los sujetos normales y que 1 ng/mL de ferritina sérica representa cerca de 8 mg de hierro depósito (46).

Después de una sola donación, una persona necesita aproximadamente 3 meses consumiendo una dieta normal para rellenar sus depósitos de hierro, a ésto se debe, que tiene que regularse la donación para evitar la deficiencia de hierro especialmente en lugares donde aún esta permitida la donación "remunerada" debiéndose limitar esta frecuencia, mediante las campañas de donación, especialmente las de índole "altruista" y las "voluntarias", estas últimas generalmente "obligadas" por las necesidades familiares.

En el hombre, cuando los requerimientos basales son aumentados de 0.9 mg/día a 1.5 mg/día por la donación de una unidad de sangre por año, los niveles de la ferritina sérica se han encontrado a la mitad. Se redujo a un cuarto del valor basal cuando los requerimientos aumentaron a 2.9 mg/día por la donación de 3 unidades por año. Finch et al. (44) encontraron que ningún donador de primera vez tuvo niveles menores a 12 ng/mL pero en el hombre que donó más de 3 unidades por año, 12.7% fueron encontrados teniendo ferritina sérica por abajo de esas cifras.

En mujeres donadoras con un requerimiento basal de 1.3 mg/día los depósitos de hierro fueron 30% más bajos que en el hombre que donó una unidad al año. Los niveles de ferritina en la mujer no cayeron tanto con donaciones múltiples como lo hicieron los hombres. Sin embargo pocas mujeres donaron más de dos veces al año. Las mujeres que dan más frecuentemente donaciones están en un significativo riesgo de desarrollar deficiencia de hierro.

Estos datos de Finch (44) indican que los donadores varones pueden dar 2 a 3 unidades de sangre por año sin un apreciable incidencia de deficiencia de hierro aunque sus depósitos sean depletados. Las mujeres parecen ser capaces de donar la mitad de la cantidad y más frecuentemente las donaciones están asociadas con una alta incidencia de deficiencia de hierro y rechazo del donador.

La primera parte del estudio se realizó aún cuando era permitido la donación remunerada en México. La donación "Remunerada fue prohibida en México en 1987 (42), a pesar de que este tipo de donación era la que sostenía el aporte necesario para cubrir las necesidades del país, cuando las campañas de concientización para la donación "voluntaria" nunca habían mostrado éxito. El cambio de actitud fue realmente motivado por el número cada vez más elevado de enfermedades infecciosas (SIDA, hepatitis, etc.) entre los receptores, puesto que un buen número de donadores "remunerados" se encontraban formando parte de los grupos de "riesgo" para contraerlas y transmitir las. En este tipo de donadores el acudir al Banco de Sangre muchas de las ocasiones representaba una forma substancial de sus ingresos económicos en una forma rápida y "cómoda" aún a pesar de estar conscientes que esto podría perjudicar su salud. Además al no existir un verdadero control de los mismos donadores, éstos en forma impune podían acudir y ser sangrados en diferentes localiza-

ciones a pesar muchas de las ocasiones de no cubrir con los requisitos exigidos por la Secretaría de Salud (41). Mandamientos que eran rotos tanto por el donador como por las Instituciones que requerían del producto.

Otro punto de interés es el mencionar que el período entre una donación y otra es variable en diversos países, 60 días en Estados Unidos (48), 112 días en Inglaterra y 45 días en México (41). En este último, de acuerdo a este precepto el donador bajo las condiciones de este intervalo de tiempo aceptable podía donar cada 6 semanas o sea hasta 8-9 ocasiones por año. Para lo que Birgegard et als. concluyeron que con un intervalo entre donación de cerca de 10 semanas, existirá un alto riesgo de deficiencia de hierro después de 6 donaciones (51).

Estos datos demuestran la gran diferencia que se encontró entre los grupos de la parte I con las dos restantes, estas últimas integradas en su totalidad por donadores "Voluntarios" en primera donación. A mayor número de donaciones es obvia la asociación a niveles muy reducidos de ferritina sérica y con ello un agotamiento de los depósitos de hierro. En los cuatro grupos de la parte I del estudio podemos observar claramente la progresión hacia la deficiencia de hierro medida por la concentración de ferritina sérica a medida que van aumentando el número de donaciones. Al tomar en forma integral a todos los donadores "remunerados" encontramos que el 45.94% de ellos tuvieron una concentración de ferritina sérica menor de 12 ng/mL. y si agregamos a los que muestran cifras manejadas como límite (12.01 a menor de 20 ng/mL.) encontramos que el 64.18% ocupa este universo. Estos datos concuerdan claramente con los obtenidos en México por Jaime y cols (47) donde encontraron que el 82.5% de los donadores "remunerados" rechazados fueron deficientes en hierro con una media de ferritina de 8.4 ng/mL, datos que también han sido ampliamente confirmados por otros autores pero en otros países (44,45,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60).

Pero es difícil el aceptar aquí, que la determinación de la ferritina sérica sea realmente un factor que nos mida las reservas del hierro corporal, debido a ingesta de sales de hierro que los donadores toman después de cada donación.

Los resultados en este grupo, demuestran claramente que los niveles de hemoglobina son inadecuados como indicadores de deficiencia de hierro y no existe correlación alguna entre las cifras de hemoglobina (normales para ser aceptados como donador) y los resultados de

la determinación de la ferritina sérica, ya que los donadores estudiados mostraron cifras aceptadas para la donación, por lo que la hemoglobina no detecta la deficiencia de hierro cuando ésta se encuentra normal, pero puede ser de gran ayuda cuando está reducida, especialmente en los donadores de primera vez. La determinación de la concentración de ferritina sérica no puede ser utilizada como un predictor de que persona desarrollará bajos niveles de hemoglobina por la donación (49), aunque hay quien ha propuesto cifras menores de hemoglobina para la aceptación de donadores (62).

La mayoría de los estudios mencionados, muestran semejantes resultados a los obtenidos en la parte II, donde fueron estudiados 59 donadores varones "Voluntarios" en su primera donación. Encontrándose el 100%, dentro de los valores de ferritina sérica consideradas como normales ( $> 20$  ng/mL) con un amplio rango y una media aritmética de 73.59 ng/mL.

En el caso de las mujeres donadoras de primera vez, "Voluntarias" y con cifras de hemoglobina y hematocrito normales, existió un porcentaje de casi el 10% que no reflejaron su deficiencia de hierro por los parámetros comunes de selección del donador, pero que se hicieron aparentes mediante la determinación de la concentración de la ferritina sérica. Para este tipo de donadoras, la donación de una simple unidad va ser un factor completamente negativo que profundizará su deficiencia y ocasionará un detrimento en sus condiciones generales además de un incremento en sus requerimientos diarios de hierro, a los cuales al sumarse los ya indispensables por los múltiples factores que acompañan a su sexo, les será sumamente difícil recuperarse porque la mayoría de las veces no se hace incapie en la importancia de suministrar las sales de hierro en la cantidad y por el tiempo necesario para reintegrar esta pérdida. Si se hacen medidas preventivas, evitando sangrar a las donadoras con historia que puede relacionarse a deficiencia de hierro (menstruantes, multigestas, lactantes, etc..) o a quienes se detecte una concentración de ferritina sérica disminuída y además se dan en su momento las medidas terapéuticas necesarias, se puede esperar tener en el futuro un mayor número de donaciones sin que se les perjudique de este grupo de mujeres. Por lo que a este grupo de donadores (mujeres) deberá de incorporarse a su panel de pruebas de estudio previo a la donación la determinación de la concentración sérica de ferritina. Idealmente, la frecuencia de la flebotomía debe ser ajustado de acuerdo a la determinación de la ferritina sérica también como con los niveles de hemoglobina (62).

---

# B I B L I O G R A F I A

---

- 1.-Cook J.D. & Skikne B.S.: Serum ferritin: a possible model for the assessment of nutrient stores. *Am. J. Clin. Nutrition.* 1982, 35:1180-1185.
- 2.-Reeves W.B. & Haurain F.I.: Clinical applicability and usefulness of ferritin measurements. *Ann. of Clin. and Lab. Sciences* 1980. 10(6): 529-535.
- 3.- Worwood M.: Serum ferritin. *CRC Crit. Rev. Clin Lab Sci.* 1979;10(2):171-204.
- 4.- Jacobs A. and Woorwood M.: The Biochemistry of Ferritin and Its Clinical implications. *Progress in Hematology*:1-24
- 5.- Worwood M.: Ferritin in Human Tissues and Serum. *Clinics in Haematology*,1982;11(2):275-307
- 6.- Linkesh w.: Serum ferritin-diagnostic and clinical significance. *Acta Med. Austriaca* 1978;5(4-5):169-71
- 7.- Mazza J.; Barr R.M.; Haist J. and Pelletier O.: Usefulness of the serum ferritin concentration in the detection of iron deficiency in a general hospital. *Can. Med. Assoc. J.* 1978 Oct 21;119(8):884-9
- 8.- Drysdale J.W. et al.: Human isoferritins in normal and disease states. *Seminars in Hematology* 1977;14:71-88
- 9.- Jacob R.A.; Sandstead H.H.; Klevay L.M. and Johnson L.K.: Utility of serum ferritin as a measure of iron deficiency in normal males undergoing repetitive flebotomy. *Blood* 1980 Nov;56(5):786-91
- 10.- Conradie J.D. and Mbhele B.E.: Quantitation of serum ferritin by enzyme-linked

immunosorbent assay (ELISA). S.Afr. Med. J. 1980 Feb 23;57(8):282-7

11.-Grail A.; Hancock B.W. and Harrison P.M.: Serum ferritin in normal individuals and patients with malignant lymphoma and chronic renal failure measure with seven different commercial immunoassay techniques. J. Clin. Pathol. 1982;35:1204-1212

12.-Dunn C.D. and Boden D.J.: Three commercial immunoradiotric "kit" assay for serum ferritin evaluated. Clin. Chem 1981 Jul;27(7):1280-3

13.-Kaltwasser J.P. and Werner E.: Ferritin. Radioimmunological determination in serum and clinical significance. Klin-Wochenschr; 1977 Nov 15;55(22):1102-7

14.- Van Oost B.A.; Willekens F.L.; Van Neerbos B.R. and Van Den Beld B: Implications of using different tissue ferritins as antigens for ferritin serum: four radioimmunoassey kits compared. Clin. Chem. 1982 Dec;28(12):2429-33

15.-Velberg L.: Plasma ferritin concentrations: their clinical significance and relevance to patient care. Can Med. Assoc. J. 1980 Jun 7;122(11):1240-8

16.- Kaltwasser J.P.; Werner E. and Becker H.: Serum ferritin as control parameter for oral iron therapy. Dtsch Med Wochenschr; 1977 Aug 12;102(32):1150-5

17.- Halliday J.W. and Powell L.W.: Serum ferritin and isoferritins in clinical medicine. Progress in Hematology; 1979;XI:229-266

18.- Jones M.B.; Worwood M. and Jacobs A.: Isoferritins in normal leucocytes. British J. of Haematol. 1983;55:73-81

19.- Skikne B; Lynch S.; Borek D. and Cook J.: Iron and blood donation. Clin. Haematol.; 1984 Feb; 13(1):271-87

21.- Williams W.J.: Hematology in the aged. Hematology. 4th edition 1990:112-117. McGraw Hill, Inc.



- 22.- Alvarez X.; Piedras J.; Cordova M.S.; Lopez X; Cano R.: refernce values for ferritin in mexican adults, men and women. Rev. Invest. Clin. 1981 Jan-mar; 33(1):13-6
- 23.- Pusch H.J.; Schramm A; Spitz G. Haubitz I.: Normal range and significance of serum ferritin; variations with age and sex. *Aktuel Gerontol* 1981 Nov;11(6):208-11
- 24.- Bailey L. et al: Serum ferritin as a measure of iron stores in adolescents. *Journal of Pediatrics*. 1982, Vol. 110, No. 5; 774-776.
- 25.- Taylor D.J. et al.: Serun ferritin in women of repordutive age. *British J. of Obst. and Gynecol.* 1982, Vol. 89, 1000-1005.
- 26.- Romslo I.; Kjell H.; Norvald S. & Augensen K.: Iron requirement in normal pregnancy as assessed by serum ferritin, serum transferrin saturation and erythrocyte protoporphyrin determinations. *British J. of Obst. and Ginecol.* 1983, Feb;90:101-7
- 27.- Casale G.' Bonora C.; Migliavacca A.; Zurita I.E. and De Nicola P.: Serum ferritin and ageing. *Age Ageing* 1981 May;10(2):119-22
- 28.- Polakka J.: Serum ferritin as a measure of iron stores during pregnancy. *Acta Obstet. Gynecol. Scand (Suppl)* 1980; suppl 95:1-31
- 29.- Poulakka J.: Serum ferritin in the evaluation of iron status in young healthy women. *Acta Obstet.Gynecol. Scand (Suppl)* 1980; suppl 95:35-41
- 30.- Siimes M.A., Adddiego J.E. Jr & Dallman P.R.: Ferritin in serum: Diagnosis of iron deficiency and iron overload in infants and childrens. *Blood* 1974; 43:581-90
- 31.- Case records of the Massachusetts general hospital. *NEJM.* 1986 Jan 2;314(1):39-49
- 32.- Taylor D.J. et al.: Effect of iron supplementation on serum ferritin levels during and after pregnancy. *British J. of Obst. and Gynecol.* 1982 Dec; 89:1001-1017

- 33.-Thane-Toe and Thein-Thau.: The effects of oral iron supplementation on ferritin level in pregnant Burmese women. *Am. J. Clin. Nutrition* 1982 Jan; 35:95-99
- 34.- Blake D.R.; Waterworth R.F. & Bacon P.A.: Assessment of iron stores in inflammation by assay of serum ferritin concentrations. *British Med. Journal.* 1981 Oct 31; 283:1147-1148
- 35.- Konijn A.M.; Carmen N.; Levy R. and Hershko C.: Ferritin synthesis in inflammation. *British J. of Haematology.* 1981, 49:361-370
- 36.- Marco Franco J.E. et al.: Serum ferritin in haemodialysis. *Nephron* 1982. 32:57-59.
- 37.- Docci D. et al.: Serum ferritin in patients on maintenance hemodialysis. *Nephron* 1983. 34:201-202
- 38.- Giler S. and Moroz C.: The significance of ferritin in malignant disease. *Biomedicine* 1978. Jul-Aug;28(4):203-6
- 39.- Bezwoda W. et al.: Significance of serum concentrations of carcinoembryonic antigen, ferritin and calcitonin in breast cancer. *Cancer* 1981. 48:1623-1628
- 40.- De la Madrid Miguel: Decreto por el cual se reforma y adiciona la Ley General de Salud. *Diario Oficial de la Federación.* 1987, Mayo 27:7-13
- 41.- Norma Técnica No. 277 para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. *Diario Oficial de la Federación.* 1988, Enero 1988:4-6.
- 42.- Artículo 43. Ley General de Salud. *Diario Oficial de la Federación.* 1987. Nov 26
- 43.- Abbott Laboratories. Ferrizyme. 1984 Jun. North Chigago, Il 60064
- 44.- Finch C.A., Cook J.D., Lobbe R.F. and Culala M.: Effect of blood donation on iron stores as evaluated by serum ferritin. *Blood* 1977;50(3):441-7

- 45.- Pederson N.S. & Morling N.: Iron stores in blood donors evaluated by serum ferritin. *Sacnd J. Haematol.* 1978 Jan;20(1):70-6
- 46.- A ABB. Standars for Blood Banks and transfusion services. 1981 10th edition. Washington, D.C.
- 47.- Jaime J.C.; Cazares R.;Mares M.A.;Marfil L.J. and Harrison C.R.: Iron stores in remunerated blood donors as evaluated by plasma ferritin levels. *Transfusion* 1988;28:62-65
- 50.- Monsen R.E.;Critchlow C.W.;Finch C.A. and Donohue D.M.: Iron balance in superdonors. *Transfusion* 1983;23:221-225
- 51.- Birgegard G et al.: Serum ferritin levels in male blood donors: relation to number of phlebotomies and iron supplementation. *Vox Sang.* 1978;34(2):65-70
- 52.- Blot I et al.: Iron reserves in blood donors, Should we prescribe systematic iron supplementation?. *Rev. Fr. Transfus-Immunoematol.* 1980 May;23(2):119-29
- 53.- Ton S.h. & Lopez C.G.: Serum ferritin concentrations in male Malaysian blood donors. *Southeast Asian. J. trop. Med. Public Health*; 1980 Mar;11(1):87-9054.- Simon T.L. Garry P.J.; Hooper E.M.: Iron stores in blood donors. *JAMA.* 1981 May;245(20):2038-43
- 55.- Ting W.C. and Lim H.C.: Iron status in blood donors. *Ann. Acad. Med. Singapore.* 1984 Jul;13(3):527-30
- 56.- Milman N. and Sondergaard M.: Iron stores in male blood donors evaluated by serum ferritin. *Transfusion* 1984 Nov-Dic;26(6):464-8
- 57.- Linpisarn S. et al.: Iron status and the effect of iron supplementation in Thai male blood donors in norther Thai male blood donors in northern Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 1986 Jun;17(2):177-83

58.-Cordovilla J.J. et al.: Evaluación de los depósitos de hierro en donantes de sangre mediante la determinación de ferritina sérica por radioinmunoanálisis. Rev. Clin Esp. 1987 Jun; 181(2):75-8

59.- Usanga E.A.: Iron stores of Nigerian blood donors as assessed by serum ferritin concentration. Cent. Afr. J. Med. 1990 Jul;36(7):170-3

60.- Milman N. and Kirchoff 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 Aug;47(2):134-9

61.- Simon T.L.; Hunt W.C. & Garry P.J.: Iron supplementation for menstruating female blood donors. Transfusion 1984;24:469-472

62.- Milman N. & kirchoff M.: The influence of blood donation on iron store assessed by serum ferritin and hemoglobin in a population survey of 1359 Danish women. Ann. Hematol. 1991 Jul;63(1):27-32