

METABOLISMO DEL HIERRO EN EL PERRO: APLICACIONES DIAGNÓSTICAS DE LA DETERMINACIÓN DEL ESTATUS FÉRRICO Y VALORES DE REFERENCIA EN LA RAZA BEAGLE

(Iron metabolism in the dog: diagnostic applications of iron status and reference values in the beagle dog)

Liste, F.; Gascón, M. y Palacio J.

Departamento de Patología Animal. C/ Miguel Servet, 177. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. 50013-ZARAGOZA.

Recibido: 20 Mayo 1994

Aceptado: 22 Septiembre 1994

RESUMEN

Este artículo describe la valoración del estatus férrico (Hierro, TIBC, Ferritina, % TRF, [TRF] y UIBC) en el perro sano, comentando su importancia en el diagnóstico diferencial de las causas de anemia, así como las diferentes metodologías utilizadas para su determinación. Los valores medios obtenidos de hierro, TIBC y ferritina séricos fueron de 181.7 ± 30.3 , 314.6 ± 28.3 $\mu\text{g/ml}$ y 155.7 ± 70.8 ng/ml respectivamente.

Palabras clave: Metabolismo. Hierro. Perro.

ABSTRACT

This article describes the iron status assessment (serum iron, TIBC, serum ferritin, % TRF, [TRF] and UIBC) in the normal dog. The importance of iron status on differential diagnosis of anemia as well as different methods to calculate iron parameters are commented. Mean values for serum iron, TIBC and serum ferritin were 181.7 ± 30.3 , 314.6 ± 28.3 $\mu\text{g/ml}$ and 155.7 ± 70.8 ng/ml respectively.

Key words: Metabolism. Iron. Dog.

INTRODUCCIÓN

El hierro es un elemento químico de importancia fundamental en la mayoría de los proce-

dos metabólicos de los animales, encontrándose ampliamente distribuido en el organismo.

Al igual que en el resto de los mamíferos, en el perro existen básicamente cinco comparti-

mentos de distribución del hierro: el compartimento mayoritario (55 % del hierro total) está constituido por la molécula de hemoglobina, en la que el hierro es necesario para la conformación del anillo hemo. El hierro contenido en el anillo hemo de la mioglobina supone el 4 % del total, mientras que una pequeña proporción (1 %) es destinada al correcto funcionamiento de enzimas ferredependientes como catalasa o peroxidasa, así como de algunos citocromos. Las reservas de hierro orgánicas suponen un 34 % del total, siendo la médula ósea, bazo, hígado y el tejido muscular los principales órganos de almacén. El hierro puede ser almacenado bajo dos formas moleculares diferentes: depósitos de ferritina (18 %) que almacenan hierro en una forma relativamente movilizable, y depósitos de hemosiderina (16 %), que es una forma más estable de acumulación de reservas. La transferrina es la principal proteína de transporte en el torrente sanguíneo, con un 1 % del hierro orgánico total. Finalmente, el 5 % restante está formado por hierro utilizado en diferentes vías metabólicas entre todos los compartimentos (ver

Figura 1) (POLLYCOVE, 1962; KANEKO, 1980).

Las necesidades diarias de hierro en la dieta de los animales domésticos varían según la edad, ritmo de crecimiento y disponibilidad efectiva de hierro. En el perro, el requerimiento férrico dietético se ha estimado en 80 ppm diarios (CHAUSOW, 1987).

La cinética del hierro en el organismo es fundamentalmente conservativa, excretándose casi exclusivamente la parte no absorbida en el intestino, en una cantidad diaria no superior a 1 miligramo. Al igual que para la absorción, los enterocitos también regulan la excreción de hierro (KANEKO, 1980; SMITH, 1989).

El metabolismo del hierro en el organismo se altera bien por un insuficiente consumo de hierro en la dieta, bien por la acción de diferentes procesos patológicos que modifican los niveles normales de hierro, transferrina y ferritina séricos. La valoración del estatus férrico en el animal, junto a la hematología, es de gran ayuda en el diagnóstico diferencial de procesos anémicos tales como la anemia por deficiencia de

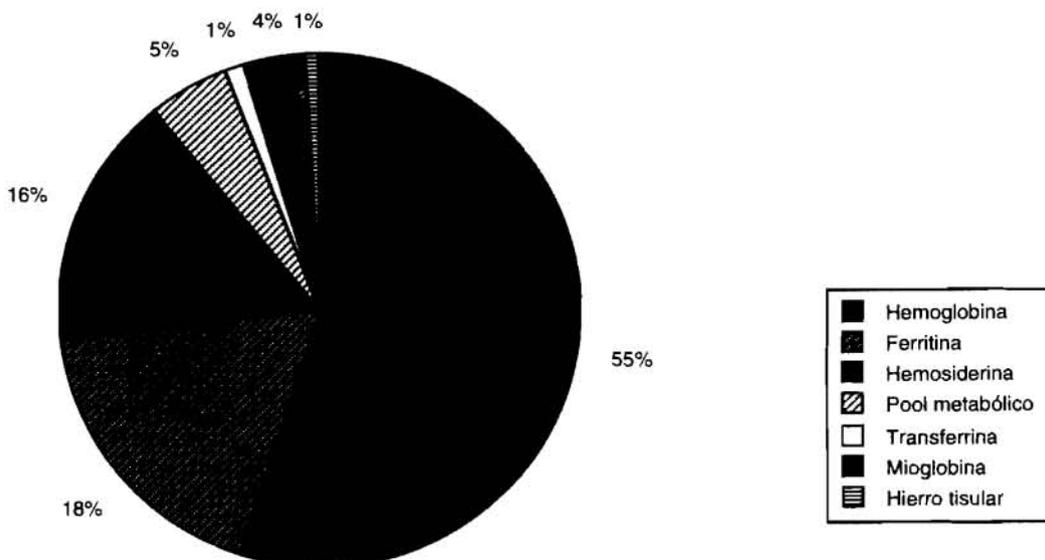


FIGURA 1. Distribución orgánica del hierro en los distintos compartimentos tisulares en el perro.

TABLA I
Estatus férrico en perros de raza Beagle (n=8)

Parámetro	$\bar{x} \pm sd$	Error estándar	Rango
Fe (ng/dl)	181.7±30.3	10.73	138-230
TIBC (ng/dl)	314.6±28.3	10.01	257-345
Ferritina (ng/dl)	155.7±70.8	25.03	80-280
% TRF	58.4±12.3	4.36	40.3-73.7
[TRF] (ng/dl)	220.2±19.8	7.01	179.9-241.5
UIBC (ng/dl)	132.8±48.3	17.08	80-204

hierro, la anemia de tipo inflamatorio o la anemia hemolítica. La correcta valoración del estatus férrico debe incluir la determinación de los tres parámetros anteriormente mencionados (WEEKS et al., 1989; SMITH, 1992).

En el presente trabajo se ha determinado el estatus férrico de 8 animales sanos de raza Beagle utilizando métodos colorimétricos para el cálculo de la concentración de hierro y TIBC, y un método inmunoenzimático ELISA para la ferritina sérica.

MATERIAL Y MÉTODOS

1) Material biológico

Se utilizaron 8 perros sanos adultos de raza Beagle (5 hembras + 3 machos), pertenecientes al Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, siendo alimentados con pienso comercial estándar (Purina Ralston Company, St Louis, Missouri). La extracción de sangre se realizó mediante punción de la vena cefálica, dejando reposar la muestra durante un mínimo de 20 minutos antes de proceder a la obtención del suero. El suero se obtuvo mediante centrifugación de la sangre completa a 3000 rpm durante 10 min, utilizándose posteriormente en la determinación de cada uno de los parámetros férricos. Los animales se alojaron en todo momento en las instalaciones

ganaderas de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, y manteniéndose de acuerdo a las directrices fijadas por el Real Decreto 223/1988 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE 67 de 18/3/1988).

2) Valoración del estatus férrico

2a) Hierro y TIBC

La concentración de hierro sérico y la capacidad total de unión del hierro a la transferrina (TIBC) se determinaron por el método de la batofenantrolina (TRINDER, 1956; RAMSAY, 1957) en kits reactivos de Boehringer Mannheim (refs. número 124 214 y 125 806), utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer, mod. Lambda 5. Los valores del porcentaje de unión del hierro a la transferrina (% TRF), la concentración de transferrina sérica ([TRF]) y la capacidad potencial de unión del hierro a la transferrina (UIBC) se estimaron a partir de los valores de hierro sérico y TIBC utilizando las siguientes fórmulas (FAIRBANKS, 1986):

$$\% \text{ Saturación de transferrina} = \frac{100 \times [\text{Hierro sérico}]}{\text{TIBC}}$$

$$[\text{TRF}] (\text{mg} / \text{dl}) = 0.7 \times \text{TIBC}$$

$$\text{UIBC} = \text{TIBC} - [\text{Hierro sérico}]$$

Estos ensayos fueron realizados de acuerdo a las recomendaciones del International Committee for Standardization in Haematology (ICSH, 1978a y 1978b).

2b) Determinación de ferritina sérica

Las concentraciones de ferritina sérica se determinaron mediante ensayos ELISA utilizando el anticuerpo monoclonal 5D56F7 antiferritina canina, de acuerdo con métodos ya descritos en la literatura (LINDER, 1972; WEEKS et al., 1988; ANDREWS et al., 1992).

2c) Análisis estadístico

Los valores medios, desviación estándar y error estándar se calcularon utilizando el programa estadístico Statview SE Graphics® de Abacus Conceptus (1988).

RESULTADOS

Los resultados de las determinaciones de las concentraciones de hierro, TIBC ferritina séricos, así como la concentración de transferrina, UIBC y porcentaje de saturación de la molécula de transferrina se describen en la Tabla 1.

DISCUSIÓN

A) Aspectos metodológicos

La valoración del estatus férrico en los animales domésticos supone la determinación de 3 parámetros en el suero: hierro, transferrina y ferritina.

La determinación del hierro sérico puede llevarse a cabo utilizando espectrofotometría de absorción atómica, métodos colorimétricos o columbimetría. El primero de los métodos citados requiere mucho tiempo para el análisis, y además mide absolutamente todo el hierro del suero, con lo que en los casos de hemólisis se producen sobreestimaciones al no distinguir el

hierro procedente de la hemoglobina del no hemínico, presente en la transferrina y ferritina (ZETTNER et al., 1966). Los métodos colorimétricos están basados en la desproteización del suero, al que posteriormente se le añade un cromógeno para su lectura. Los métodos colorimétricos son accesibles para la mayoría de los laboratorios, aunque tienen el inconveniente de requerir un gran volumen de suero para su análisis y ser relativamente lentos. El uso del columbímetro, basado en la medición del número de electrones desprendidos tras el paso de una corriente eléctrica por la muestra que origina una transición entre los dos estados de oxidación de los átomos de hierro ($Fe^{2+} \leftarrow Fe^{3+} + e^-$), es el método más rápido y preciso, pero tiene el inconveniente de su alto precio. La cuantificación de la transferrina sérica puede hacerse directamente por métodos inmunológicos, pero estos procedimientos requieren la puesta a punto de la técnica en particular, siendo imposible su realización si no se dispone de anticuerpos específicos. Normalmente, la transferrina se mide en términos de contenido férrico una vez que ha sido totalmente saturada con hierro. El contenido total de hierro en la transferrina se denomina capacidad total de unión del hierro a la transferrina y se expresa como TIBC. En esta determinación pueden utilizarse tanto métodos colorimétricos como columbimétricos, que poseen las mismas ventajas e inconvenientes anteriormente expuestos para el cálculo de la concentración de hierro sérico (TRINDER, 1956; RAMSAY, 1957; SMITH et al., 1981).

Para la determinación de ferritina, existen técnicas de radioinmunoensayo (HALLIDAY et al., 1975) e inmunoradiométricas (ADDISON et al., 1972) de alta sensibilidad desarrolladas en el caso del hombre. Su inconveniente es la necesidad de utilizar material isotópico radiactivo, lo que obliga a tomar medidas adecuadas de protección además de ser relativamente costoso. Las técnicas de enzimoimmunoensayo (KONIJN et al., 1982) no presentan estos inconvenientes. Sin embargo, y dada la especificidad

TABLA 2

Diagnóstico laboratorial diferencial de los procesos anémicos del perro basado en su estatus férrico

	Deficiencia Fe	Inflamación	Hemolítica	Fallo renal crónico	Alt. medulares
[Fe]	↓	↓	↑	↓, =	↑, =
TIBC	↓, =	↓, =	↑, =	↓, =	
[Ferritina]	↓	↑	↑	=, ↑	Variable
Depósitos orgánicos	↓	↑	↑	=, ↑	

biológica de la molécula de ferritina (RICHTER, 1967), la preparación de un anticuerpo antiferritina canina es indispensable en la puesta a punto de la técnica (WEEKS et al., 1988; ANDREWS et al., 1992). En nuestro estudio, la amable cesión del anticuerpo monoclonal 5D56F7 antiferritina canina por parte del Dr. J. E. Smith del Department of Veterinary Pathology of Kansas State University permitió la realización de los ensayos. La valoración de los depósitos de hemosiderina, realizable mediante la obtención de una muestra de biopsia medular y posterior tinción por el método de Pearls (LEWIS, 1979) puede obviarse si se determina la concentración de ferritina sérica, que es un índice de las reservas orgánicas de hierro (WEEKS et al., 1989).

Los valores normales de hierro, TIBC y ferritina séricos en el perro han sido establecidos usando un ensayo columbimétrico (WEEKS et al., 1989), obteniéndose valores algo menores que los nuestros para la concentración de hierro sérico. En la bibliografía se han citado interferencias de lectura con pigmentos férricos como la bilirrubina (SMITH, 1989) en la determinación colorimétrica del hierro sérico, que bien podrían explicar estas variaciones.

Existen variaciones diurnas en la concentración de hierro de acuerdo con los niveles de cortisol sérico. Sin embargo, estas variaciones oscilan únicamente dentro del rango de valores

normales, por lo que la obtención del suero para el análisis puede realizarse a cualquier hora del día. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la administración de glucocorticoides produce una elevación de los niveles de hierro sérico (HARVEY et al., 1987), por lo que la interpretación del estatus férrico en animales bajo este tipo de terapia habrá de ser cuidadosa. En la bibliografía consultada no se han encontrado estudios en la especie canina acerca de la influencia de la edad del individuo y los estados gestacionales en las hembras en el estatus férrico del animal, como de hecho ocurre en el hombre (FIELDING, 1980). En los animales objeto de nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas relativas al sexo. Sin embargo, creemos que dado el bajo volumen de muestra utilizado (n=8) no es posible establecer una conclusión firme en este sentido.

B) Valoración de los parámetros férricos. Diagnóstico diferencial del tipo de anemia

La Tabla 2 describe la evolución del estatus férrico en los diferentes tipos de anemia.

El interés de la determinación del estatus férrico en el diagnóstico del tipo de anemia es claro. Por ejemplo, el diagnóstico de una deficiencia de hierro basado en una baja concentración de hemoglobina o hallazgo de hematíes

microcíticos e hipocrómicos no es adecuado. La mayor parte del hierro orgánico se utiliza en la síntesis de hemoglobina (NATHANSON, 1984), por lo que otros sistemas que requieren hierro, como los citocromos o las enzimas ferredoxinas pueden verse privadas de hierro sin que haya variaciones en el perfil hematológico (FINCH, 1980). Tampoco el hallazgo de unos niveles bajos de hierro sérico no son diagnósticos por sí mismos de un estado deficiente, ya que pueden ser compatibles con procesos inflamatorios que determinan una respuesta de fase aguda en el animal. La concentración de transferrina puede disminuir en los estados inflamatorios, manteniéndose dentro del rango de valores normales en la deficiencia de hierro en el perro (SMITH, 1992), al contrario del aumento observado en el caso del hombre (FIELDING, 1980). La determinación de ferritina permite la distinción de ambos procesos, ya que sus niveles disminuyen en la situación deficiente y tienden a elevarse durante la fase inflamatoria como reflejo del aumento de los depósitos férricos en las células del sistema reticuloendotelial (WEEKS et al., 1989; SMITH, 1992).

En la anemia hemolítica, por el contrario, el estatus férrico presenta una elevación de los niveles de hierro sérico a consecuencia de una mayor absorción intestinal y del incremento de la tasa de eritropoyesis (FIELDING 1980; McLAREN et al., 1989). En este caso, los niveles de ferritina también se encuentran elevados (SMITH, 1992).

En las anemias producidas por un fallo renal crónico que ocasiona un déficit de producción de eritropoyetina, los valores de hierro y TIBC séricos son bajos en un 50 % de los animales (COWGILL, 1992), mientras que los niveles séricos de ferritina pueden aumentar o no modificarse (MILMAN et al., 1980).

El estatus férrico también presenta variaciones en procesos que cursan con alteraciones medulares, pudiendo incrementarse los valores de hierro sérico en las anemias aplásicas o hipoplásicas, como consecuencia de un bloqueo en

la transferencia del hierro desde el compartimento plasmático al medular (SMITH, 1992).

Por lo anteriormente expuesto, puede verse la importancia de la determinación del estatus férrico en la valoración clínica de la anemia en el perro, que complementa los análisis hematológicos y bioquímicos, siendo imprescindible en ocasiones (deficiencia de hierro) en el diagnóstico exacto del proceso. Si bien la determinación sistemática de los parámetros férricos en los animales como parte del perfil analítico puede ser difícil de realizar, no conviene olvidar su importancia en casos en que la anemia es un síntoma importante en el conjunto del cuadro clínico.

BIBLIOGRAFÍA

- ADDISON, G.; BEARNISH, M.; HALES, C.; HODGKINS, M.; JACOBS, A. and LEWLLIN. 1972. An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *J. Clin. Pathol.*, 25: 326-329.
- ANDREWS, G. A.; SMITH, J. E.; GRAY, M.; CHAVEY, P. S. and WEEKS, B. R. 1992. An improved ferritin assay for canine sera. *Vet. Clin. Pathol.*, 21, 2: 57-60.
- CHAUSOW, D. G. and CZARNECKI-MAUDEN, G. L. 1987. Estimation of the dietary iron requirement for the weanling puppy and kitten. *J. Nutr.*, 117: 928-932.
- COWGILL, L. D. 1992. Pathophysiology and management of anemia in chronic progressive renal failure. *Semin. Vet. Med. Surg.*, 7, 3:175-182.
- FAIRBANKS, V. F. and KLEE, G. G. 1986. Biochemical aspects of hematology. En: *Textbook of Clinical Chemistry*, pp. 1495-1588. Ed: N. W. Tietz. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1919 p.
- FIELDING, J. 1980. Serum iron and Iron binding capacity. En: *Methods in hematology*. Vol. 1. Iron, pp. 15-43. Ed: J. D. Cook. 1st Edition, Churchill Livingstone, Philadelphia, 180 p.
- FINCH, C. A. 1980. Drugs effective in iron-deficiency and other hypochromic anemias. En: *The pharmacological basis of therapeutics*, pp. 1315-1330 Eds.: A. G. Gilman, L. S. Goodman and A. Gil-

- man. 6th ed., Macmillan publishing Co., New York, 1756 pp.
- HALLIDAY, J. W.; GERA, K. L. and POWELL, L. W. 1975. Solid phase radioimmunoassay for serum ferritin. *Clin. Chim. Acta*, 58 : 207-214.
- HARVEY, J. W.; LEVIN, D. E. and CHEN, C. L. 1987. Potential effects of glucocorticoids on serum iron concentration in dogs. *Vet. Clin. Pathol.*, 16, 2: 46-50.
- INTERNATIONAL COMMITTEE FOR STANDARDIZATION IN HAEMATOLOGY (ICSH). 1978a. Recommendations for measurement of serum iron in human blood. *Br. J. Haem.*, 38: 291-294.
- INTERNATIONAL COMMITTEE FOR STANDARDIZATION IN HAEMATOLOGY (ICSH). 1978b. The measurement of total and unsaturated iron-binding capacity in serum. *Br. J. Haem.*, 38: 281-287.
- KANEKO, J. J. 1980. Iron metabolism. En: *Clinical biochemistry of domestic animals*, pp: 649-669. Ed: J. J. Kaneko. 3rd. ed., Academic Press. New York, 1280 p.
- KONIJN, A. M.; LEVY, R.; LINK, G. and HERSHKO, C. 1982. A rapid and sensitive ELISA for serum ferritin employing a fluorogenic substrate. *J. Immunol. Methods*, 54 : 297-307.
- LEWIS, H. B. and REBAR, A. H. 1979. Appendix 2. Stains and staining techniques. En: *Bone marrow evaluation in veterinary practice*, p. 64. Ed.: Ralston Purina Company, St Louis, Missouri, 71 p.
- LINDER, M. C. and MUNRO, H. N. 1972. Assay of tissue ferritin. *Anal. Biochem.*, 48: 266-278.
- MILMAN, N.; CHRISTENSEN, T. E.; PEDERSEN, N. S. and VISFELDT, J. 1980. Serum ferritin and bone marrow iron in non-dialysis, peritoneal dialysis and hemodialysis patients with chronic renal failure. *Acta Med. Scand.*, 207: 201-205.
- McLAREN, G. D.; COLVILLE, J. and NATHANSON, M. H. 1989. Mechanism of increased intestinal iron absorption in dogs with hemolytic anemia: analysis of mucosal iron kinetics. *Blood*, 74 (suppl 1): 138a.
- NATHANSON, M. H. and McLAREN, G. D. 1984. Internal iron exchange in normal and iron-deficient Beagle dogs: relationship to iron absorption (abstr). *Clin. Res.*, 32: 317a.
- POLLYCOVE, M. and MAQSOOD, M. 1962. Existence of an erythropoietic labile iron pool in animals. *Nature*, 194: 152-154.
- RAMSAY, W. N. M. 1957. The determination of the total iron-binding capacity of serum. *Clin. Chim. Acta*, 2: 221-226.
- RICHTER, G. W. 1967. Serological cross-reactions of human, rat and horse ferritins. *Exp. Mol. Pathol.*, 6: 96-101.
- SMITH, J. E.; MOORE, K. and SCHONEWEIS, D. 1981. Coulometric technique for iron determinations. *Am. J. Vet. Res.*, 42 , 6: 1084-1085.
- SMITH, J. E. 1989. Iron metabolism and its disorders. En: *Clinical biochemistry of domestic animals*, pp. 256-273. Ed: J. J. Kaneko. 4th ed., Academic Press, New York, 932 p.
- SMITH, J. E. 1992. Iron metabolism in dogs and cats. *Comp. Cont. Ed.*, 14, 1: 39-43.
- TRINDER, P. 1956. The improved determination of iron in serum. *J. Clin. Pathol.*, 9: 170-172.
- WEEKS, B. R.; SMITH, J. E. and PHILLIPS, R. M. 1988. Enzyme-linked immunosorbent assay for canine serum ferritin , using monoclonal anti-canine ferritin immunoglobulin G. *Am. J. Vet. Res.*, 49: 1193-1195.
- WEEKS, B. R.; SMITH, J. E. and NORTHROP, J. K. 1989. Relationship of serum ferritin and iron concentrations and serum total iron-binding capacity to nonheme iron stores in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 50, 2: 198-200.
- ZETTNER, A.; SYLVIA, L. C. and CAPACHO-DELGADO, L. 1966. The determination of serum iron and iron binding capacity by atomic absorption spectroscopy. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45, 5: 533-540.