




Anemia ferropénica en el laboratorio clínico

Iron deficiency anemia in the clinical laboratory

Anemia por deficiência de ferro no laboratório clínico

 <http://dx.doi.org/10.35954/SM2020.39.1.4>

Christian Pereyra ^a  <https://orcid.org/0000-0003-4845-6122>

(a) Laboratorio de Análisis Clínicos. Hospital Central de las Fuerzas Armadas.

RESUMEN

La deficiencia de hierro o ferropenia es la causa más común de anemia y suele ser secundaria a pérdidas de sangre; la malabsorción es una causa menos frecuente. Por lo general, los síntomas son inespecíficos. Los eritrocitos tienden a ser microcíticos e hipocrómicos, y los depósitos de hierro son bajos, como muestra el descenso de ferritina sérica y las bajas concentraciones séricas de hierro junto con alta capacidad total de fijación de hierro. En los últimos años, el laboratorio clínico ha incorporado nuevos biomarcadores a los tradicionalmente empleados, con el fin de mejorar su contribución al diagnóstico y seguimiento de la ferropenia. Así, se cuenta en la actualidad con un conjunto de herramientas en el laboratorio con este fin, entre las cuales cabe destacar: diagnóstico morfológico en sangre periférica, los índices hematimétricos, las concentraciones plasmáticas de transferrina junto con los índices calculados a partir de ella, ferritina, receptor soluble de transferrina y hemoglobina. Al efectuarse el diagnóstico, se debe sospechar pérdida oculta de sangre hasta que se demuestre lo contrario. El tratamiento consiste en reposición de hierro y tratamiento de la causa de la hemorragia.

El presente trabajo es una revisión bibliográfica sobre anemia ferropénica, enfocada principalmente en los estudios que se llevan a cabo en el laboratorio para su diagnóstico y seguimiento, con el objetivo de hacer un aporte actualizado sobre el tema.

PALABRAS CLAVE: Anemia; Anemia Ferropénica; Biomarcadores; Deficiencia de Hierro.

ABSTRACT

Iron deficiency or iron deficiency is the most common cause of anemia and is usually secondary to blood loss; malabsorption is less common. Malabsorption is a less common cause. Symptoms are usually nonspecific. Erythrocytes tend to be microcytic and hypochromic, and iron stores are low, as shown by the decrease in serum ferritin and low serum iron concentrations along with high total iron binding capacity. total iron binding capacity. In recent years, the clinical laboratory has incorporated new biomarkers to those traditionally used, with the aim of to those traditionally used, in order to improve their contribution to the diagnosis and follow-up of iron deficiency. iron deficiency. Thus, a set of tools is now available in the laboratory for this purpose, these include: morphological diagnosis in peripheral blood, hemacytometric indices, plasma concentrations of transferrin together with the indices calculated from it, ferritin, soluble transferrin receptor and hemoglobin. When the diagnosis is made, occult blood loss should be suspected until it is demonstrated. until proven otherwise. Treatment consists of iron replacement and treatment of the cause of the hemorrhage.

Recibido para evaluación: Agosto 2019

Aceptado para publicación: Diciembre 2019

Correspondencia: Av. 8 de Octubre 3020. C.P.11600. Montevideo, Uruguay. Tel.: (+598) 24876666 int.1715.

E-mail de contacto: cpereyra12002@gmail.com



The present work is a bibliographic review on iron deficiency anemia, focusing mainly on the studies carried out in the laboratory for diagnosis and follow-up, with the aim of making an updated contribution on the subject, to make an updated contribution on the subject.

KEY WORDS: Anemia; Anemia, Iron-Deficiency; Biomarkers; Iron Deficiency.

RESUMO

A deficiência de ferro ou ferropenia é a causa mais comum de anemia e geralmente é secundária à perda de sangue; a má absorção é menos comum. A má absorção é uma causa menos comum. Os sintomas geralmente não são específicos.

Os eritrócitos tendem a ser microcíticos e hipocrômicos, e as reservas de ferro são baixas, como mostra a diminuição da ferritina sérica e baixas concentrações de ferro sérico, juntamente com a alta capacidade total de ligação do ferro. Nos últimos anos, o laboratório clínico incorporou novos biomarcadores aos tradicionalmente utilizados, a fim de melhorar sua contribuição para o diagnóstico e monitoramento da deficiência de ferro. Assim, existe atualmente um conjunto de ferramentas no laboratório para este fim,

Estes incluem: diagnóstico morfológico no sangue periférico, índices hematométricos, concentrações plasmáticas de transferrina juntamente com os índices calculados a partir dele, ferritina, receptor de transferrina solúvel e hemoglobina. No diagnóstico, a perda de sangue oculto deve ser suspeita até prova em contrário. O tratamento consiste na substituição do ferro e no tratamento da causa do sangramento. O presente trabalho é uma revisão bibliográfica sobre anemia por deficiência de ferro, focalizada principalmente nos estudos realizados no laboratório para seu diagnóstico e acompanhamento, com o objetivo de fazer uma contribuição atualizada sobre o assunto.

PALAVRAS CHAVE: Anemia; Anemia Ferropriva; Biomarcadores; Deficiência de Ferro.

INTRODUCCIÓN

La anemia constituye uno de los principales motivos de consulta clínica, fundamentalmente por su elevada incidencia en niños, mujeres jóvenes e individuos de edad avanzada (particularmente en estados de malnutrición); además, constituye un signo que suele aparecer en el curso de un elevado número de enfermedades, presentando una frecuencia muy elevada en países del tercer mundo debido a graves problemas de desnutrición y enfermedades transmisibles. En particular, la anemia causada por deficiencia de hierro es la más frecuente dentro de los tipos de anemia. El hierro, un elemento abundante en la Tierra, es esencial para todos los organismos vivos, ya que interviene en muchas funciones metabólicas fundamentales, como el control del transporte de electrones a través de la cadena respiratoria, la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) y el aporte de oxígeno

a los tejidos. De todos modos, este elemento en estado libre en el organismo es muy tóxico, por lo que es fundamental el mantenimiento de un equilibrio entre absorción intestinal y control de sus reservas. Habitualmente, el hierro realiza su función unido a proteínas. Así, podemos hallar el hierro como: cofactor de varias enzimas (oxidases, peroxidases, catalasas e hidroxilasas), componente esencial de proteínas de transporte (transferrina, hemoglobina, mioglobina) o elemento activo en la cadena de transporte de electrones (citocromos y proteínas de hierro-azufre). La importancia biológica del hierro para el organismo, está dada principalmente por su capacidad óxido-reductora, pudiendo aceptar o donar un electrón, encontrándose por lo tanto en dos estados de oxidación: oxidado (ión férrico o Fe^{3+}) o reducido (ión ferroso o Fe^{2+}). Pero esta capacidad óxido-reductora es también la base de su toxicidad, pues si se encuentra en estado libre (no unido a proteínas) o en

concentraciones elevadas, cataliza la producción de radicales libres hidroxilo, los cuales son muy reactivos y generan oxidación de lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos, conduciendo a situaciones de estrés oxidativo que dan como resultado muerte celular (1,2).

Es por ello que el equilibrio del hierro en el organismo está estrictamente controlado de forma compleja. Esa alta complejidad determina que la prevalencia de entidades clínicas relacionadas con la homeostasis del hierro sea elevada, lo que implica múltiples manifestaciones clínicas y situaciones que van desde la deficiencia de hierro, con o sin anemia, hasta la sobrecarga de hierro hereditaria o adquirida. La falta de hierro es un trastorno más frecuente que la sobrecarga, y es el resultado de un agotamiento de los depósitos, un bloqueo de los depósitos (inflamación crónica), defectos de la síntesis de globina (talasemias) y defectos en la síntesis del grupo hemo (siderocrosis). Estos trastornos presentan un comportamiento clínico y biológico similar, pudiendo cursar con anemia microcítica e hipocromía. Por lo tanto, es crucial realizar el diagnóstico diferencial antes de iniciar cualquier tipo de tratamiento, en particular la administración de hierro (2).

El hierro en el organismo se distribuye en tres grandes compartimentos: funcional, depósito y transporte. Aproximadamente, el 60-70% está constituido por hierro funcional que se localiza esencialmente en la hemoglobina de los hematíes maduros y precursores eritroides, y en la mioglobina (músculo esquelético). Entre el 30-40% del hierro restante es almacenado (hierro de depósito) en las células del parénquima hepático y en los macrófagos del sistema reticuloendotelial como ferritina y hemosiderina. Únicamente 3-4 mg de hierro (0,1-0,2% del hierro del organismo) circulan en el plasma como hierro intercambiable unido a la transferrina (1,3).

DESARROLLO DEL TEMA

La anemia ferropénica obedece a una disminución de la concentración de hierro en el organismo, presentando un desarrollo progresivo en varias etapas en las que ocurre una disminución

gradual del hierro en los depósitos y del tamaño del glóbulo rojo.

Es así que, a partir de lo anterior, se pueden diferenciar tres etapas:

1. Ferropenia pre latente: se caracteriza por desaparición del hierro de reserva con disminución del porcentaje de sideroblastos. En esta etapa la concentración de hierro circulante (sideremia) puede ser normal aún y sólo puede hallarse disminuida la ferritina plasmática debido a la ausencia de hierro de reserva.

2. Ferropenia latente: ocurre un descenso en el índice de saturación de transferrina, que suele ser inferior al 12% (los valores de referencia oscilan entre 30-35%). Si bien en esta etapa la sideremia es variable, suele estar disminuida al igual que la ferritina plasmática, al tiempo que ocurre un aumento de la capacidad de saturación de la transferrina.

3. Eritropoyesis ferropénica: ocurre descenso de la concentración de hemoglobina, microcitosis e hipocromía (anemia microcítica hipocrómica). En esta etapa se observa un descenso en todas las magnitudes sanguíneas relacionadas con el metabolismo del hierro (sideremia, ferritina, índice de saturación de transferrina) (1,2).

A continuación se abordará con más detalle el metabolismo del hierro, lo cual es crucial para entender el complejo mecanismo que explica la homeostasis de este elemento en el organismo.

Metabolismo del hierro

El requerimiento diario de hierro es de 20 a 25 mg, de los cuales los individuos sanos solo necesitan obtener de la dieta de 1 a 2 mg al día, ya que el resto se consigue a partir de la fagocitosis de los hematíes senescentes y la reutilización por el sistema reticuloendotelial del hierro contenido en los mismos (4). Los 1-2 mg por día que se pierden de hierro, se deben a descamación de las células intestinales, del tracto urinario y menstruación en mujeres, y son repuestos a través de la dieta por los enterocitos duodenales.



Así, en el metabolismo del hierro participan:

- 1. Enterocitos del duodeno:** aquí, la absorción del hierro hemo ocurre a través de la proteína transportadora HCP1 y el hierro 3+ (ión férrico) a través del transportador metálico divalente 1 (DMT1) previa reducción a la forma hierro 2+ por acción de la reductasa citocromo B duodenal (DcytB).
- 2. Sistema retículo endotelial:** los macrófagos que forman parte de este sistema fagocitan los eritrocitos senescentes y liberan el hierro que contienen para ser reutilizado.
- 3. Proteínas de transporte:** la transferrina (Tf) es la que juega aquí un rol fundamental.
- 4. Receptor de transferrina (TfR):** localizado en la superficie de las células nucleadas.
- 5. Proteínas de almacenamiento:** ferritina, presente en hepatocitos, y hemosiderina en los macrófagos.
- 6. Proteína transmembrana ferroportina (FPN):** es la que favorece la movilización del hierro en las reservas en hepatocitos, enterocitos y macrófagos.

La dieta aporta dos tipos de hierro: el fácilmente absorbible hierro hemo (ión ferroso o Fe^{2+} , proveniente de carnes, pescado) y el hierro no hemo (ión férrico o Fe^{3+} , procedente de legumbres y vegetales), de menor absorción. Únicamente se absorbe un 5-10% del hierro aportado por la dieta. La absorción de hierro se ve modificada por diversas sustancias. Así, los ácidos orgánicos y los azúcares aumentan la absorción del hierro no hemo, mientras que los fitatos, tanatos, oxalatos, calcio, fosforo, cereales, té, productos lácteos y los antiácidos la disminuyen (4).

La absorción se produce en los enterocitos del duodeno y del yeyuno proximal. Para ello es necesario que el hierro se encuentre en su forma reducida (Fe^{2+}), pasando a su interior a través del DMT1. Una vez en el interior del enterocito, es necesaria su transformación en hierro férrico (Fe^{3+}) para su paso por la FPN y posterior unión a la Tf plasmática. El hierro que no es captado por la Tf se perderá con la descamación celular

intestinal. Transportado por la Tf, el hierro es distribuido por el organismo para su utilización en los tejidos. En condiciones habituales el índice de saturación de la Tf (IST) es del 25-35%. El TfR aumenta en situaciones de ferropenia y su afinidad por la Tf es mayor cuanto mayor es el índice de saturación de transferrina (IST). Una vez que se produce la unión Tf-TfR, el hierro se internaliza por medio de endosomas para su utilización o almacenaje, mientras que el complejo TfR-Tf libre de hierro (apoferritina) se traslada nuevamente a la membrana celular, quedando anclado el TfR y liberándose la Tf. En el caso de los eritroblastos, el 80% del hierro es destinado a la síntesis de hemoglobina y el 20% a su almacenaje. Las reservas de hierro están constituidas por la ferritina (glicoproteína con Fe^{3+} en su interior) y la hemosiderina (derivado de la ferritina con mayor contenido de hierro). El hierro de la ferritina es fácil de movilizar mediante su glicosilación, mientras que el hierro contenido en la hemosiderina es de movilización lenta. Gracias a que la hemosiderina tiende a formar agregados, se puede visualizar a nivel histológico mediante la tinción de Perls. Tanto la ferritina como la hemosiderina están localizadas en los macrófagos de todos los tejidos, siendo su presencia más abundante en la médula ósea, hígado, bazo y musculatura (4).

La homeostasis del hierro, requiere una compleja regulación en la cual la hepcidina juega un papel fundamental. La hepcidina es una hormona peptídica de síntesis hepática. Actúa estimulando la internalización y destrucción de la ferroportina por los hepatocitos, enterocitos y macrófagos, disminuyendo la liberación de hierro a nivel plasmático y fomentando su acumulación a nivel tisular, fundamentalmente en hígado y epitelio intestinal. También disminuye la expresión del DMT1 en los enterocitos, disminuyendo la absorción de hierro intestinal. La ausencia de hierro disponible a nivel plasmático protege frente a infecciones, pues la mayoría de los microorganismos requieren hierro para su proliferación. La síntesis de hepcidina hepática esta estimulada por el exceso de hierro

plasmático y tisular, por las infecciones y por un estado inflamatorio sistémico. Su expresión está mediada por diversas citoquinas, entre las cuales la interleucina IL-6 desempeña un papel relevante. El aumento de hepcidina viene acompañado de un descenso de hierro plasmático y un aumento de las reservas férricas. Se ha comprobado que el nivel plasmático de ferritina es directamente proporcional al de hepcidina (5). Por lo tanto, las enfermedades inflamatorias sistémicas causan un déficit funcional de hierro que altera la eritropoyesis y provoca finalmente anemia de los trastornos crónicos. Por otro lado, entre los estímulos que inhiben la síntesis de hepcidina, encontramos la hipoxia tisular, el déficit de hierro y el aumento de la eritropoyetina (EPO). La disminución de la expresión de hepcidina conlleva un aumento de la absorción intestinal de hierro y el incremento de la movilización de los depósitos de hierro, aumentando el hierro plasmático disponible.

El déficit de hierro en el organismo se traduce en unos niveles bajos de la ferritina plasmática y del IST, desencadenantes de una respuesta sistémica compensatoria. En sus fases iniciales la ferropenia inhibe la síntesis de hepcidina para potenciar la absorción y movilización del hierro a nivel plasmático. Si el déficit persiste, disminuye la eritropoyesis y aparece la hipoxia tisular, y con ella el aumento de la expresión del factor inducido por hipoxia inducible factor 2 alfa (HIF2 α), que estimula a nivel renal la síntesis de EPO y aumenta el número de DMT1 en los enterocitos. En esta fase, el objetivo es aumentar el nivel de hierro plasmático y simultáneamente favorecer su empleo para mantener una correcta eritropoyesis y utilización celular del hierro (6,7). En situaciones prolongadas de ferropenia, las reservas de hierro se agotan, de modo que el mecanismo de compensación se vuelve insuficiente, dando lugar a una eritropoyesis ineficaz que se traduce en la presencia en sangre periférica de los hematíes hipocrómicos y microcíticos característicos de la anemia ferropénica.

Causas de la deficiencia de hierro

Existen muchas causas para la ferropenia, siendo muy frecuentes algunas situaciones fisiológicas como el aumento de las necesidades de hierro en el embarazo, durante la lactancia, en recién nacidos, durante la infancia y adolescencia y en mujeres durante la menstruación (6). En países en vías de desarrollo, es frecuente la deficiencia de hierro nutricional debido a una dieta hipocalórica basada en cereales, de por sí con bajo contenido de hierro y además con altas cantidades de fitatos que dificultan su absorción. En muchos de estos países son frecuentes también las infecciones intestinales por nemátodos, que pueden causar anemia ferropénica, y las esquistosomiasis crónicas, que pueden causar sangrados intestinales y por lo tanto, pérdidas de hierro. En países desarrollados, las causas más frecuentes son:

1. Déficit de aporte por dietas mal estructuradas o no balanceadas.
2. Disminución de la absorción: puede ser por malabsorción (enfermedad celíaca, esprúe, enfermedades inflamatorias intestinales), cirugías (*by pass* gástrico, gastrectomía), por pH gástrico alto (aclorhidria, tratamiento con inhibidores de la bomba de protones), y por infección por *Helicobacter pylori*.
3. Aumento de las pérdidas de hierro: sangrados digestivos (pólipos, úlcera péptica, lesiones ulcerosas intestinales, lesiones debidas a cáncer), urológicos (hematuria) o ginecológicos (hipermenorrea, metrorragias).
4. Origen multifactorial: frecuente en adultos mayores en los que pueden darse por coincidencia de varias situaciones: déficit de ingesta, hemorragias digestivas, inflamación, tratamiento con ciertos fármacos.
5. Origen genético: anemia refractaria a hierro por alteración del gen que regula la expresión de hepcidina, lo cual lleva a un aumento de la misma y refractariedad al tratamiento con hierro, déficit de



ceruloplasmina y de Tf, mutaciones del gen que codifica el DMT1 (se asocian con anemias microcíticas autosómicas recesivas).

6. Otras causas: hemólisis intravascular con pérdidas urinarias (por ejemplo, hemoglobinuria paroxística nocturna), hemólisis mecánicas, anemias hemolíticas congénitas, donaciones de sangre frecuentes sin control de los niveles de hierro.

Manifestaciones clínicas de la deficiencia de hierro

Lo más frecuente es que la anemia ferropénica se instaure lentamente, siendo bien tolerada por los pacientes, por lo que en muchas ocasiones es asintomática o se acompaña únicamente de síntomas inespecíficos como debilidad, cefalea, irritabilidad y diversos grados de astenia e intolerancia al ejercicio. Algunos pacientes con deficiencia de hierro (con o sin anemia) pueden quejarse de molestias orales, boca seca, atrofia de las papilas linguales, y en ocasiones de alopecia. Hay situaciones en las que una anemia ferropénica grave comporta riesgos importantes. Por ejemplo, en el embarazo se asocia a una mayor probabilidad de parto prematuro, bajo peso del recién nacido y mortalidad durante el parto tanto de la madre como del recién nacido. La anemia ferropénica favorece las infecciones y en pacientes con patología cardiovascular puede desencadenar fallo cardíaco. En general, suele ser peor tolerada en pacientes con patologías múltiples y de edad avanzada, en los que su presencia puede disminuir notablemente su calidad de vida (4,7).

Estudio de la ferropenia en el laboratorio

Existen varias magnitudes biológicas que permiten evaluar la deficiencia de hierro en el laboratorio.

1. Morfología eritrocitaria y observación del frotis sanguíneo: en anemia por falta de hierro, los hematíes son microcíticos (volumen corpuscular medio < 80 fL) e hipocrómicos debido a un menor contenido de hemoglobina (hemoglobina

corpuscular media disminuida). También puede observarse un aumento en el ancho de distribución eritrocitaria (ADE), lo que indica anisocitosis eritrocitaria. Es frecuente que estos hallazgos estén acompañados de aumento en el número de plaquetas y leucocitos, pero esto desaparece con el tratamiento. La disminución de la síntesis de hemoglobina, en más del 90% de los casos, obedece a un déficit de hierro. En el 10% restante, otros mecanismos que determinan el equilibrio del hierro en el organismo pueden estar implicados, como por ejemplo la llegada insuficiente de hierro a los eritroblastos por anemia inflamatoria, o trastornos congénitos de la síntesis de cadenas de globina (talasemias) y defectos congénitos en la síntesis del grupo hemo (anemias sideroblásticas). Los trastornos mencionados también darían lugar a una microcitosis junto a hipocromía en la observación del frotis de sangre periférica, por lo que antes de iniciar el tratamiento con hierro debe realizarse el correcto diagnóstico diferencial de la anemia hipocrómica y microcítica (2,4,7).

La tinción con May Grünwald-Giemsa es la más recomendable y ampliamente utilizada para la coloración de extendidos de sangre periférica, lo que permite observar las alteraciones morfológicas de las células sanguíneas, y en el caso particular de la anemia ferropénica, la microcitosis e hipocromía de los eritrocitos así como otras características que pueden aparecer en estos casos (anisocitosis, poiquilocitosis).

2. Transferrina: es una glucoproteína que presenta una cadena peptídica de 679 aminoácidos unida a dos cadenas de oligosacáridos enlazadas entre sí. La proteína dispone de dos puntos de unión reversible para dos iones hierro Fe³⁺, uno en el extremo carboxi-terminal y otro en el amino-terminal. Su migración electroforética corresponde a la zona de las beta-globulinas, y es su concentración la mayoritaria de esta fracción. Su síntesis es fundamentalmente hepática, y se produce cuando la ferritina intracelular de los hepatocitos disminuye. El gen que la codifica se sitúa en el

brazo largo del cromosoma 3 (3q21), cerca del correspondiente al receptor de la transferrina. La molécula sintetizada inicialmente tiene de 19 a 20 aminoácidos más, y antes de pasar a la circulación sufre una proteólisis, y posteriormente una glicosilación. Tiene una semivida de 8 días. Se han descrito más de 20 variantes genéticas de transferrina. La transferrina existe en la circulación como apotransferrina y formas mono y diférricas (8).

La función principal de la transferrina es transportar el hierro procedente de la absorción intestinal, del catabolismo de la hemoglobina o de los depósitos tisulares hacia los reticulocitos y eritroblastos para la síntesis de hemoglobina o hacia el hígado para su almacenamiento, a través de la interacción con receptores específicos. También tiene un efecto protector, pues al unirse al hierro evita las consecuencias adversas que podría tener su libre circulación, y bacteriostático, ya que limita el hierro disponible necesario para el desarrollo bacteriano. La concentración plasmática de transferrina se encuentra elevada en la ferropenia, en el embarazo y durante el tratamiento con anticonceptivos orales, ya que los estrógenos aumentan su síntesis. Se halla disminuida en las siguientes situaciones: a) el déficit congénito de transferrina, b) en cualquier inflamación crónica o neoplasia, c) en infecciones, d) en estados de catabolismo o pérdida proteica, tales como la malnutrición y el síndrome nefrótico, e) en los estados en que el organismo tiene una presión oncótica elevada, tales como el mieloma múltiple o las enfermedades hepatocelulares, y f) en los estados de sobrecarga férrica. La sensibilidad en el diagnóstico de la ferropenia se ve limitada, ya que en los estados de ferropenia asociados a una malnutrición hay una disminución de la síntesis de transferrina, y su concentración plasmática permanece dentro del intervalo de referencia.

En el laboratorio, los métodos más empleados para la determinación de transferrina son la inmunofelometría y la inmunoturbidimetría.

La **capacidad de fijación de hierro**, se refiere a la cantidad máxima de hierro que puede ser transportada por un volumen determinado de suero. Dado que la transferrina es la principal proteína de transporte de hierro en la sangre, es una medida indirecta de su concentración. El método clásico se basa en la determinación de la concentración de hierro que es capaz de fijar el suero tras la saturación con hierro Fe^{3+} y la eliminación del exceso mediante adsorción con carbonato de calcio o magnesio (9). La capacidad de fijación de hierro por la transferrina (**CFTf**) es la concentración de hierro teórica que transporta la transferrina presente en un volumen determinado de suero. En el cálculo de la capacidad de fijación del hierro por la transferrina, se considera que cada molécula de transferrina es capaz de transportar dos iones Fe^{3+} .

El **índice de saturación de transferrina (IST)** es el cociente expresado como porcentaje entre la sideremia y la capacidad de fijación del hierro por la transferrina; expresa el porcentaje de hierro presente en el suero en relación con la totalidad del hierro que teóricamente se puede unir a la transferrina presente. El IST se halla elevado en la hemocromatosis hereditaria, la ingestión excesiva del hierro, las talasemias, la deficiencia de la vitamina B6, las anemias aplásicas, y las anemias sideroblásticas. Se encuentra disminuido en la eritropoyesis ferropénica, las enfermedades malignas del estómago e intestino delgado, y en el embarazo. El IST es un marcador de la eritropoyesis en relación al hierro: define el hierro presente en el compartimento funcional, en contraposición al que se encuentra en el compartimento de reserva. Por otro lado, la saturación de transferrina parece ser un test válido para el cribado de pacientes seleccionados con sospecha de sobrecarga férrica y enfermedad hepática para realizar el estudio genético de hemocromatosis hereditaria (HFE).

3. Ferritina: las ferritinas constituyen una amplia familia de proteínas especializadas en almacenamiento del hierro. Una molécula de ferritina es capaz de contener hasta 4500 átomos de hierro



3+ (bajo forma de hidróxido de fosfato férrico insoluble). La estructura de la apoferritina está compuesta por 24 subunidades unidas por enlaces no covalentes. Cada subunidad están formadas por dos tipos de polipéptidos: el monómero H y el monómero L. La proporción de estas subunidades varía dependiendo del tipo de tejido, de forma tal que en riñón y corazón predomina el monómero H, mientras que en hígado y bazo el L.

La forma molecular que contiene el hierro se denomina holoferritina o simplemente ferritina. La mayor parte de las células del organismo contienen ferritina en el citosol, y es especialmente abundante su expresión en las células relacionadas con la síntesis de hemoglobina (eritroblastos y reticulocitos), con su degradación (macrófagos), o con su reserva (hepatocitos) (10).

La ferritina citosólica es producida por el retículo endoplásmico liso y no está glicosilada. La síntesis de ferritina es regulada principalmente a nivel post-transcripcional en el citosol y depende de la concentración de hierro libre intracelular. Este es el sistema de regulación mejor caracterizado. La ferritina circulante solo contiene cantidades traza de hierro, por lo que no contribuye al transporte interno de hierro. Es sintetizada por el retículo endoplásmico rugoso y es glicosilada en el aparato de Golgi antes de su liberación. La ferritina plasmática es un homopolímero L (60-80% glicosilada). La mayoría de las células del organismo producen ferritina y secretan una proporción de ferritina glicosilada al plasma, por lo que la concentración de ferritina plasmática refleja la cantidad de ferritina del organismo y por tanto los depósitos de hierro, siempre teniendo en cuenta que esto es así en ausencia de ciertas patologías (enfermedades inflamatorias agudas, infecciones, cáncer), pues en estos casos la ferritina puede estar aumentada al ser una proteína reactante de fase aguda. La ferritina convierte el Fe^{2+} en Fe^{3+} . Asimismo, facilita hierro en situaciones celulares críticas a la vez que captura el hierro intracelular, y así protege a los lípidos, ADN y proteínas del potencial efecto tóxico del hierro.

En ausencia de inflamación, la concentración plasmática de ferritina se correlaciona estrechamente con los depósitos de hierro del organismo: 1 $\mu g/L$ (microgramo por litro) de ferritina sérica corresponde a 8-10 mg de hierro almacenado en un adulto sano (11).

Los valores de ferritina varían en función de edad y sexo: los recién nacidos tienen concentraciones séricas altas de ferritina, luego disminuyen en los siguientes 5 meses de vida. Durante la infancia va a ir en aumento hasta el fin de la adolescencia. Existe una alta variación intraindividual, con un coeficiente de variación biológica intraindividual (CVi) del 20%. La medición de la concentración plasmática de la ferritina está indicada cuando se necesita detectar deficiencia de hierro y también para monitorizar el tratamiento de la deficiencia. La ferritina es una proteína de fase aguda que aumenta significativamente en procesos inflamatorios, infección, hepatopatías (incluyendo hemocromatosis hereditaria) y ciertas neoplasias. El aumento de la concentración de ferritina en enfermedades crónicas, independiente de los depósitos de hierro, constituye la principal limitación del uso de la ferritina para la detección de deficiencia de hierro. Aunque la ferritina no es un buen marcador para la detección de sobrecarga férrica, resulta útil para monitorizar el tratamiento con sangrías de la hemocromatosis hereditaria.

Los métodos actuales para la determinación de ferritina en el laboratorio se basan en inmunoanálisis.

4. Receptor soluble de transferrina: es una proteína transmembrana. Cada molécula de este receptor puede unir dos moléculas de transferrina. A pH fisiológico, la afinidad del receptor por la transferrina diférrica es mayor que para la monoférrica o la apotransferrina.

El receptor de transferrina TfR1 es esencial para la captación celular de hierro. Se localiza en la mayoría de las células, con la excepción de los hematíes maduros. Su mayor expresión ocurre en los tejidos que sintetizan hemoglobina (precursores eritroides de la médula ósea), y también en

células normales en fase de división rápida, en la placenta y en tejidos neoplásicos. Se distribuye en la superficie celular y a nivel intracelular. El número de TfR1 superficial está determinado por la proliferación celular, diferenciación celular y la demanda de hierro celular. La regulación positiva de la expresión TfR1 puede resultar de un aumento de la síntesis de TfR de novo o de la movilización de TfR1 desde el pool de almacenamiento. La concentración de TfR en la superficie celular, está cuidadosamente regulada por el ARNm del TfR, de acuerdo con el contenido interno de hierro de la célula y sus requisitos de hierro. Aquellas células con mayor deficiencia de hierro tienen un mayor número de receptores, mientras que aquellas con niveles de hierro normal los expresan en menor cantidad.

La distinción entre la anemia de las enfermedades crónicas y la anemia ferropénica puede ser difícil. En estos casos, el TfR resulta ser un marcador útil, ya que los pacientes con anemia ferropénica presentan un aumento de la concentración media de TfR en comparación con pacientes con anemia crónica secundaria a otras enfermedades. El cálculo del cociente TfR/log concentración de ferritina presenta una alta sensibilidad y especificidad para la detección de la ferropenia.

El TfR también es útil para distinguir la anemia ferropénica debida a situaciones frecuentes en la infancia, adolescencia y embarazo, cuando las reservas son uniformemente bajas o incluso ausentes; en estas situaciones, no siempre hay una eritropoyesis ferropénica, y los niveles de TfR no están elevados. También hay que tener en cuenta que cuando la anemia ferropénica coexiste con una anemia de enfermedades crónicas, las concentraciones de TfR aumentan debido a la ferropenia subyacente, lo que evita la necesidad de un examen de médula ósea.

Aparte de las demandas de hierro celular, la proliferación de eritrocitos es un estímulo importante para la síntesis y expresión de TfR eritroide. La eritropoyetina (EPO), una glicoproteína predominantemente sintetizada por el riñón, es el principal factor de crecimiento que regula la producción de

eritrocitos. Actúa a través de receptores de superficie específicos en células progenitoras de eritrocitos y estimula la proliferación y expresión de TfR. El receptor de transferrina TfR2 tiene un papel menos significativo que el TfR1, ya que presenta 25 veces menos afinidad por el complejo hierro-transferrina que TfR1. Sin embargo, su expresión es mayor en tejido hepático y duodenal. Mutaciones en el gen que codifica para TfR2 causan la hemocromatosis hereditaria tipo 3, en la que ocurre un exceso de absorción del hierro de la dieta y unos depósitos de hierro en varios tejidos, sobre todo en hígado.

Así, el hígado resulta ser es el principal regulador de la absorción de hierro en la dieta y de la liberación de hierro almacenado. Las moléculas de TfR2 actúan como sensores de la concentración plasmática de transferrina diférrica. La expresión de TfR2 depende directamente de la concentración de transferrina diférrica (holotransferrina), independientemente de la presencia de anemia o de sobrecarga férrica hepática. Existe evidencia de que en el hígado el TfR2, la hemojuvelina y el HFE, son reguladores de la síntesis y secreción de hepcidina (12,13).

En el suero humano, menos del 1% del receptor de transferrina se encuentra intacto, la mayor parte se encuentra bajo la forma de receptor soluble de transferrina, el cual resulta de la pérdida de los dominios transmembrana y citoplasmático del receptor. Es una forma monomérica que forma un complejo con una molécula de transferrina. Los receptores solubles se originan en el ciclo endocítico de los TfR: una pequeña cantidad de estos TfR endocitados son procesados de manera diferente y, luego, son liberados por exocitosis para formar complejos con la transferrina en la circulación. Los precursores medulares eritroides (eritroblastos) constituyen la principal fuente de receptor soluble de transferrina (70-80% del total). Existe una buena correlación entre la concentración sérica de receptor de transferrina y la actividad proliferativa eritropoyética medular (14,15).



La concentración de receptor soluble de transferrina aumenta rápidamente en la eritropoyesis ferropénica, y no está afectada por inflamación, infección, hepatopatías, terapia con estrógenos o embarazo.

Los ensayos actuales de laboratorio para la determinación de receptor soluble de Tf están basados en inmunoanálisis. Presentan la gran ventaja de utilizar un muy pequeño volumen de muestra, lo que hace que el receptor soluble de Tf sea un parámetro útil para pacientes pediátricos. Actualmente no existen materiales de referencia certificados para el receptor soluble de transferrina, ni tampoco consenso entre los fabricantes sobre la obtención de calibradores. La disparidad de valores de referencia y valores discriminantes para la concentración de receptor soluble de transferrina, dependiendo del calibrador y el método empleado, dificulta su aplicación clínica en la práctica, y obliga a que el seguimiento para un mismo paciente se realice en un único laboratorio. Existe actualmente el uso de índices que relacionan el receptor soluble de Tf y la ferritina. El más utilizado es el índice de ferritina (receptor soluble de transferrina/log Ferritina). Este índice es especialmente útil para diferenciar la anemia ferropénica de la anemia de enfermedades crónicas y para detectar deficiencia de hierro en pacientes con anemia de enfermedades crónicas, ya que es más sensible para detectar un déficit de hierro comparado con las medidas aisladas del receptor soluble de transferrina y ferritina (11,16-18).

5. Hemoglobina e índices hematimétricos: la definición de anemia basada en la concentración de hemoglobina en sangre, sigue siendo la definición más aceptada según la Organización Mundial de la Salud (OMS), 1988 (19).

Una concentración de hemoglobina normal, no excluye una situación de ferropenia, pero una disminución de la concentración en el tiempo sí puede dar lugar a sospecha de ferropenia, lo cual suele ir acompañado de alteraciones en índices hematimétricos: disminución del volumen

corpuscular medio y hemoglobina corpuscular media, aumento del ancho de distribución eritrocitaria. La anemia se clasifica en base al volumen corpuscular medio como microcítica, normocítica o macrocítica, y según la concentración corpuscular media de hemoglobina en hipocrómica, normocrómica o hiperocrómica. Actualmente, los laboratorios cuentan con instrumentos analizadores automáticos que, aparte de medir la concentración de hemoglobina, permiten obtener varios parámetros de interés. A partir de los histogramas de volumen celular, se obtiene el ancho de distribución eritrocitario, un reflejo de la anisocitosis de la población de eritrocitos, lo que ha permitido clasificar las anemias en homogéneas o heterogéneas según el grado de anisocitosis presente. La hemoglobina corpuscular media o HCM es una magnitud que informa sobre el valor medio del contenido hemoglobínico de los hematíes circulantes y se correlaciona con el volumen corpuscular medio. Los modernos contadores hematológicos, aplicando principios de impedancia y citometría de flujo, reportan parámetros avanzados junto al hemograma tradicional. La información adicional es potencialmente útil en el diagnóstico diferencial de diversas situaciones clínicas (20). La vida media del eritrocito en sangre periférica es aproximadamente de 120 días y diversas poblaciones de células con diferentes grados de maduración y contenido hemoglobínico, pueden coexistir al mismo tiempo. El término anisocitosis se refiere a la variedad de volúmenes eritrocitarios, mientras que la anisocromía se refiere a la coexistencia de hematíes con distinto contenido hemoglobínico. Entretanto que el VCM representa el valor medio de los volúmenes de los hematíes, el valor de la ADE representa la desviación estándar, permitiendo estimar la contribución de las subpoblaciones eritrocitarias con volúmenes marginales. Así, estos nuevos parámetros aportan información acerca de los valores de hemoglobina en cada célula individual, además del valor medio de hemoglobina o hemoglobina corpuscular media, ya que permiten medir los porcentajes

de subpoblaciones eritrocitarias con contenido de hemoglobina por encima o por debajo de ciertos valores, y clasificarlos en eritrocitos hipocrómicos e hiperocrómicos respectivamente. También son medidos por distintos analizadores los porcentajes de hematíes microcíticos y macrocíticos, o con volúmenes por debajo o por encima de ciertos valores, respectivamente.

6. Reticulocitos: el recuento de reticulocitos permite la clasificación fisiopatológica de la anemia. La anemia causada por una insuficiente producción de eritrocitos por parte de la médula ósea, conllevará una reducción del recuento de reticulocitos (anemia arregenerativa), mientras que cuando es causada por un aumento en su destrucción, esto provocará un aumento en el recuento de reticulocitos como mecanismo compensatorio (anemia regenerativa). Al ser su vida media de 1-2 días, el recuento de reticulocitos permite además la identificación temprana de la normalización de la eritropoyesis después de la intervención terapéutica (hierro, cobalamina, ácido fólico, etc.), así como la monitorización de la recuperación de la aplasia medular y del trasplante de médula ósea.

7. Fracción de reticulocitos inmaduros en el diagnóstico de la anemia: la fracción de reticulocitos inmaduros (FRI) se basa en el contenido de ácido ribonucleico (ARN) de los hematíes. Los reticulocitos más inmaduros son más ricos en ARN. La FRI es un índice precoz y sensible de eritropoyesis, ya que los reticulocitos inmaduros aparecen en una proporción mayor cuando la producción de eritrocitos a nivel de la médula ósea aumenta. Dicho índice se puede considerar una medida de aceleración en la producción eritrocitaria, y el conteo de reticulocitos, en valor absoluto, una medida cuantitativa de la eficacia de la eritropoyesis (21,22).

Por lo tanto, este parámetro es útil en el diagnóstico diferencial de estos tipos de anemias: a) Anemias caracterizadas por un aumento en la eritropoyesis, como por ejemplo las anemias hemolíticas

y la esferocitosis hereditaria, b) Anemias que cursan con hipoplasia de la médula, en las que los valores están disminuidos. c) Anemias agudas en infecciones o síndromes mielodisplásicos, en las que existe una disociación entre el recuento total de reticulocitos (reducido o normal) y la FRI, que puede estar aumentada.

8. Índices reticulocitarios: junto al recuento automatizado de reticulocitos, fundamental para la evaluación de la actividad eritropoyética, disponemos de otros índices asociados. Los más prometedores desde el punto de vista clínico son: la hemoglobina reticulocitaria y el volumen reticulocitario. La hemoglobina reticulocitaria refleja la síntesis de hemoglobina en la masa eritrocitaria de la médula ósea, y es una estimación de la cantidad de hierro que llega de manera efectiva a la médula y su adecuación a las necesidades de la eritropoyesis (23).

Se recomienda el empleo conjunto de índices hematológicos eritrocitarios (volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media) y una combinación de proteínas: concentración sérica de ferritina, hierro, transferrina y el cálculo del índice de saturación de transferrina (la concentración de hierro siempre debe interpretarse al mismo tiempo que la de la transferrina), y la concentración sanguínea de hemoglobina.

DISCUSIÓN

Existen en el laboratorio una serie de parámetros o magnitudes biológicas (biomarcadores) que contribuyen al diagnóstico de las anemias ferropénicas. De acuerdo con la bibliografía consultada, la ferritina resulta ser esencial para el diagnóstico y manejo de los pacientes con ferropenia, constituyéndose en el mejor marcador para ferropenia, salvo cuando se trata de pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas, cáncer, enfermedad hepática o renal crónica, ya que por ser la ferritina un reactante de fase aguda puede estar aumentada en estas situaciones. En estos casos es conveniente utilizar transferrina o alguno de sus índices



junto con la ferritina para evaluar la ferropenia. El receptor de transferrina (TfR) puede tener utilidad en algunos casos. La distinción entre la anemia de las enfermedades crónicas y la anemia ferropénica puede ser difícil, y en estos casos, el TfR resulta ser un marcador útil, ya que los pacientes con anemia ferropénica presentan un aumento de la concentración media de TfR en comparación con pacientes con anemia crónica secundaria a otras enfermedades. El cálculo del cociente TfR/log concentración de ferritina presenta una alta sensibilidad y especificidad para la detección de la ferropenia. Si bien la hepcidina y la eritropoyetina son hormonas con un rol fisiológico fundamental en la homeostasis del hierro, su medición tiene una utilidad clínica más bien limitada para el estudio de las ferropenias en el laboratorio (7,11,24). La observación del extendido de sangre periférica

coloreado por la técnica de May Grunwald-Giemsa, es de utilidad para el diagnóstico morfológico de la anemia ferropénica. Cabe mencionar, que es importante establecer un diagnóstico diferencial entre las anemias ferropénicas y aquellos tipos de anemia que también cursan con microcitosis e hipocromía y que tienen un comportamiento clínico-biológico muy similar a las anemias ferropénicas. Así, el diagnóstico diferencial deberá hacerse con la anemia de procesos crónicos, talasemia y anemia sideroblástica, teniendo en cuenta para ello varios de los parámetros de laboratorio que se han mencionado (figura 1) (25).

Por último, cabe destacar que los índices hematimétricos y reticulocitarios, son de gran utilidad en el diagnóstico diferencial de anemia microcítica, déficit funcional de hierro, control con agentes estimulantes de eritropoyesis y anemia hemolítica.

	Anemia Ferropénica	Anemia por Trastornos Crónicos	Talasemia Menor (rasgo talasémico)	Anemia Sideroblástica
VCM (volumen corpuscular medio), HCM (hemoglobina corpuscular media)	Disminuido	Normal/Bajo	Muy disminuido	Bajo si es congénita, normal si es adquirida
Sideremia	Disminuido	Disminuido	Normal/Elevado	Elevado
CTFH (capacidad total de fijación de hierro)	Elevada	Disminuida	Normal	Normal
IST (%) (índice de saturación de transferencia)	Disminuido	Disminuido	Aumentado	Aumentado
Ferritina sérica	Baja	Normal/Alta	Normal/Alta	Elevada
Depósito de hierro medular	Ausente	Presente	Presente	Presente
Hierro en eritroblastos	Ausente	Ausente	Presente	En anillo
Electroforesis de hemoglobina	Normal	Normal	Aumento HbA ₂ en rasgo beta talasémico	Normal

Figura 1. Biomarcadores a considerar para el diagnóstico diferencial entre anemia ferropénica y otras anemias. Adaptada de Clara Camaschella (25).

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERESES: El autor no reporta ningún conflicto de interés. El estudio se realizó con recursos propios del autor y/o la institución a la que representa.

REFERENCIAS

- (1) Pérez Surribas D, Gella Concustell A, Cruz Iglesias E, Hermoso Durán S, Urrechaga Igartua E, Alcaide Martín MJ, *et al.* Estudio de la ferropenia en el laboratorio clínico. *Revista del Laboratorio Clínico* January 2019. doi:10.1016/j.labcli.2019.01.004
- (2) Vives Corrons JL, Altés A. Anemia ferropénica y trastornos del metabolismo del hierro. En: Sans-Sabrafen J, Besses Raebel L, Vives Corrons JL. *Hematología Clínica*. 5a.ed. Madrid : Elsevier, 2006. p. 127-161.
- (3) Del Castillo Busto ME, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A. The potential of mass spectrometry to study iron-containing proteins used in clinical diagnosis. *Anal Chim Acta* 2009; 634(1):1-14. doi: 10.1016/j.aca.2008.12.014
- (4) Moya Arnao M, Blanquer M, Moraleda Jiménez JM. Anemias carenciales. *Medicine* 2016; 12(20):1136-1147. doi:10.1016/j.med.2016.10.002
- (5) Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, *et al.* Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004; 306(5704):2090-3. doi: 10.1126/science.1104742
- (6) Gonzalez de Villambrosia S, Nunez J, Gonzalez Mesones B, Insunza A. Trastornos del metabolismo del hierro y anemia ferropénica. *Medicine* 2012; 11(20):1202-11. doi: 10.1016/S0304-5412(12)70471-7
- (7) Braunstein EM. Anemia ferropénica (Anemia por hemorragia crónica, clorosis) [Sitio Web]. Kenilworth, NJ., USA; [actualizada noviembre de 2016; acceso 4 de julio de 2019]. Disponible en: <https://www.msmanuals.com/es/professional/hematolog%C3%ADa-y-oncolog%C3%ADa/anemias-causadas-por-deficiencia-de-la-eritropoyesis/anemia-ferrop%C3%A9nica>.
- (8) Jett M, Jamieson GA, DeBernardo SL. The carbohydrate sequence of the glycopeptide chains of human transferrin. *J Biol Chem* 1971; 246(11):3686-93.
- (9) Ramsay WN. The determination of the total iron-binding capacity of serum. 1957. *Clin Chim Acta* 1997; 259(1-2):25-30. doi: 10.1016/s0009-8981(96)06489-3
- (10) Worwood M. The laboratory assessment of iron status an update. *Clin Chim Acta* 1997; 259(1-2):3-23. doi: 10.1016/s0009-8981(96)06488-1
- (11) Cook J, Baynes R, Skikne B. Iron deficiency and the measurement of iron status. *Nutr Res Rev* 1992; 5(1):198-202. doi: 10.1079/NRR19920014
- (12) Flemming RE, Bacon BR. Orchestration of iron homeostasis. *N Engl J Med* 2005; 352(17):1741-4. doi: 10.1056/NEJMp048363
- (13) Ganz T. Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 2003; 102(3):783-8. doi: 10.1182/blood-2003-03-0672
- (14) Vernet M. Le récepteur de la transferrine: rôle dans le métabolisme du fer et intérêt en biologie clinique. *Ann Biol Clin* 1999; 57(1):9-17.
- (15) Skikne BS, Flowers CH, Cook JD. Serum transferrin receptor: a quantitative measure of tissue iron deficiency. *Blood* 1990; 75(9):1870-6.
- (16) Suominen P, Punnonen K, Rajamäki A, Irjala K. Serum transferrin receptor and transferrin receptor-ferritin index identify healthy subjects with subclinical iron deficits. *Blood* 1998; 92(8):2934-9.
- (17) Sherwood RA, Pippard MJ, Peters TJ. Iron homeostasis and the assessment of iron status. *Ann Clin Biochem* 1998; 35(Pt 6):693-708. doi: 10.1177/000456329803500601
- (18) Punnonen K, Irjala K, Rajamäki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997; 89(3):1052-7.



(19) World Health Organization. Guidelines for the use of iron supplements to prevent and treat iron deficiency anemia. 1998.

Rebecca J. Stoltzfus, Michele L. Dreyfuss, Eds. Available from: https://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/guidelines_for_Iron_supplementation.pdf?ua=1 [Consulted 12/06/2019].

(20) Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Review Biomarkers of hypochromia: the contemporary assessment of Iron status and erythropoiesis. *Biomed Res Int* 2013; 603-786.

doi: 10.1155/2013/603786

(21) Piva E, Brugnara C, Chiandetti L, Plebani M. Automated reticulocyte counting: state of the art and clinical applications in the evaluation of erythropoiesis.

Clin Chem Lab Med 2010; 48(10):1369-80.

doi: 10.1515/CCLM.2010.292

(22) Buttarello M, Bulian P, Farina G, Petris MG, Temporin V, Toffolo L. Five fully automated methods for performing immature reticulocyte fraction: comparison in diagnosis of bone marrow aplasia. *Am J Clin Pathol* 2002; 117(6):871-9.

doi: 10.1309/VJAA-L52P-FGRM-QGRU

(23) Buttarello M. Laboratory diagnosis of anemia: are the old and new red cell parameters useful in classification and treatment, how?

Int J Lab Hematol 2016; 38 Suppl 1:123-32.

doi: 10.1111/ijlh.12500

(24) Thomas W, Hinchliffe R, Briggs C, Macdougall I, Littlewood T, Cavill I.

Guideline for the laboratory diagnosis of functional iron deficiency. *Br J Haematol* 2013; 161(5):639-48.

doi: 10.1111/bjh.12311

(25) Camaschella C. Iron-deficiency anemia.

N Engl J Med 2015; 372(19):1832-43.

doi: 10.1056/NEJMra1401038