

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS
“DR. SERAFÍN RUIZ DE ZÁRATE RUIZ”
UNIDAD DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
SANTA CLARA, VILLA CLARA

ARTÍCULO ORIGINAL

VALORES DE REFERENCIA DE HIERRO EN SANGRE DEL CORDÓN UMBILICAL SEGÚN ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA VISIBLE

Por:

Lic. Yansy Romero García¹, MSc. Tahiry Gómez Hernández², MSc. Melba Villar Valdés³ y MSc. Leticia Cristina Béquer Mendoza⁴

1. Licenciada en Enfermería. Residente de cuarto año de Bioquímica Clínica. Departamento de Morfofisiología. Facultad de Medicina. UCM-VC. e-mail: yansyrg@ucm.vcl.sld.cu
2. Licenciada en Química. Máster en Química Analítica. Aspirante a Investigador. Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la Unidad de Investigaciones Biomédicas. UCM-VC.
3. Especialista de II Grado en Bioquímica Clínica. Máster en Bioquímica. Departamento de Morfofisiología. Facultad de Medicina. Asistente. UCM-VC.
4. Licenciada en Biología. Máster en Bioquímica. Aspirante a Investigador. Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la Unidad de Investigaciones Biomédicas. UCM-VC.

Resumen

La sangre del cordón umbilical ha sido de interés científico en los últimos años, como un medio para obtener muestras de sangre del neonato y determinar varios parámetros que brinden una información detallada de su estado nutricional y metabólico. Entre las técnicas reconocidas para la determinación de hierro, el método que utiliza la ferrozina resulta asequible para países en vías de desarrollo como el nuestro. Para asegurar una correcta interpretación de los resultados, es necesario establecer los valores de referencia de este mineral, teniendo en cuenta las condiciones específicas de análisis utilizadas. El objetivo del presente trabajo es determinar los valores de referencia de hierro en muestras de sangre del cordón umbilical de recién nacidos del Hospital Ginecoobstétrico “Mariana Grajales”, a través del método espectrofotométrico ultravioleta visible, que utiliza la ferrozina en las condiciones de trabajo del Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la Unidad de Investigaciones Biomédicas. Se procesaron 91 muestras de sangre del cordón umbilical, y se informaron valores que concuerdan con los publicados en la literatura. Estadísticamente, la variable en estudio presenta una distribución normal para recién nacidos masculinos y femeninos, por lo que el intervalo informado es válido para ambos sexos.

Descriptor DeCS:

SANGRE FETAL
HIERRO/sangre
ESPECTROFOTOMETRIA
ULTRAVIOLETA/métodos

Subject headings:

FETAL BLOOD
IRON/blood
SPECTROPHOTOMETRY
ULTRAVIOLET/METHODS

Introducción

En la pasada década, la sangre del cordón umbilical quedó establecida como fuente de células madre eritropoyéticas^{1,2}. En los últimos años, ha sido de interés científico como un medio útil para la determinación de varios parámetros que brindan una información detallada del estado nutricional y metabólico del individuo al momento de su nacimiento³. Entre estos, resulta de particular importancia el hierro, elemento traza que en 1973 fue declarado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como mineral esencial⁴, por resultar imprescindible en un sinnúmero de procesos biológicos que ocurren en nuestro organismo⁵.

La homeostasis de este mineral se logra con la coordinación de varios mecanismos que regulan su absorción, reciclaje y movilización de sus depósitos⁶. A pesar de esto, el organismo sufre grandes pérdidas diarias de hierro de manera fisiológica, que son mucho más notables en la mujer en edad fértil. Durante el embarazo, la eliminación o depleción de hierro de la gestante representa más de tres veces el volumen de pérdidas diarias de un hombre adulto sano⁷. Muchos estudios corroboran que los depósitos de hierro del feto pueden verse afectados por la magnitud de las reservas de la madre, pues este extrae hierro en cantidades proporcionales a sus necesidades de crecimiento⁸. Los niveles de hierro sérico constituyen una medida de la cantidad de hierro unido a la transferrina, y se ven afectados en un gran número de condiciones clínicas. Por todo esto, resulta evidente la importancia que tiene una valoración temprana del estado del hierro en el neonato, para predecir el riesgo que este tendrá de padecer una ferropenia o, incluso, una anemia ferripriva después de los primeros meses de vida^{9,10}.

Existen métodos directos e indirectos para la estimación del hierro corporal. Los directos son muy invasivos¹¹. Los indirectos, mediante los cuales se realizan mediciones del hierro contenido en el llamado “compartimento funcional”, resultan, por tanto, más prácticos. Entre estos se puede citar la determinación de diferentes marcadores séricos, como capacidad total de captación, saturación de transferrina, receptor de transferrina sérica (sTfR) y hierro sérico, entre otros¹².

En particular, para determinar el hierro sérico, se han implementado técnicas, como la espectrometría de emisión de llama, o la espectrometría de masa de plasma inductivamente acoplado, pero esta tecnología es muy cara y de muy difícil acceso para países en desarrollo. Existen también diferentes modificaciones de los métodos colorimétricos que han sido propuestos por los comités internacionales¹³. En ese caso está el método que emplea la ferrozina¹⁴. Este tipo de determinación tiene como limitación la gran variabilidad en sus valores, debido a múltiples factores fisiológicos y técnicos. Por esta razón, no se encuentran publicados valores de referencia para este metal, sino que se recomienda fuertemente que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia, para lograr una correcta interpretación de sus resultados.

Con el presente trabajo nos proponemos determinar los valores de referencia de hierro en muestras de sangre del cordón umbilical en recién nacidos, mediante el método espectrofotométrico ultravioleta visible (UV-Vis) que utiliza la ferrozina, en las condiciones de trabajo del Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la Unidad de Investigaciones Biomédicas (UNIB), en la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara “Dr. Serafín Ruiz de Zárate Ruiz”.

Métodos

Esta es una investigación básica aplicada. El universo de estudio lo constituyeron los recién nacidos en el Hospital Universitario Ginecoobstétrico “Mariana Grajales”, en Santa Clara. La población estuvo formada por los nacidos en el período comprendido entre los días 6 y 30 de abril del 2009, que cumplieron con los criterios de inclusión establecidos para el propósito del estudio. Se obtuvieron 96 muestras de sangre del cordón umbilical; de ellas, se seleccionaron 91, que representaron un 34,8 % del total de recién nacidos en ese período. De acuerdo con nuestros criterios de inclusión y exclusión, se aceptaron las muestras pertenecientes a recién nacidos sanos, producto de embarazos de más de 37 semanas de gestación, con peso mayor de 2 500 g al momento del nacimiento. Se rechazaron las muestras de hijos de madres seropositivas al VIH, infectadas con hepatitis B o que tuvieran hábitos tóxicos, así como aquellas muestras en las que se observó hemólisis durante el proceso de centrifugación. En todo momento se cumplieron las regulaciones éticas establecidas¹⁵ para la investigación científica en muestras de origen humano.

Las muestras obtenidas se llevaron al Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la UNIB, donde fueron centrifugadas y posteriormente procesadas con el método espectrofotométrico UV-Vis, que utiliza la ferrozina como agente cromógeno, para la determinación de la concentración de hierro sérico. Los reactivos empleados fueron el juego de reactivos para la determinación de hierro, de fabricación nacional¹⁶. La cristalería y los materiales plásticos utilizados se trataron previamente con una disolución de ácido clorhídrico al 1,2 mmol/l, y agua desionizada; en ningún momento se emplearon materiales metálicos, para evitar todo tipo de interferencia. Las condiciones de trabajo seguidas fueron las publicadas en el prospecto del reactivo utilizado, y las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Spekol 11. Los resultados se registraron en una hoja de cálculo de Excel, perteneciente al paquete Office 2007, y para el procesamiento estadístico se empleó el programa SPSS 15. Con todos estos elementos, se determinó como intervalo de referencia para nuestro laboratorio la media aritmética ± 1 desviación estándar ($X \pm 1$ DE).

Resultados

Las 91 muestras seleccionadas fueron procesadas con las condiciones descritas anteriormente. Los valores de hierro sérico encontrados oscilaron entre 7,11 $\mu\text{mol/l}$ y 42,59 $\mu\text{mol/l}$. La concentración de hierro media calculada en la muestra fue de 22,78 $\mu\text{mol/l}$ y la desviación estándar determinada de 7,62. Con estos datos, se propuso como intervalo de referencia para la determinación de hierro sérico por el método descrito, un rango entre 15,16 $\mu\text{mol/l}$ y 30,40 $\mu\text{mol/l}$, ($X \pm 1$ DE), para el Laboratorio de la UNIB, en sus condiciones de trabajo.

Para aceptar este intervalo, se requiere que la muestra tenga una distribución normal; para comprobarlo, se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov con corrección de la significación Lilliefors, y se obtuvo un valor del estadígrafo de 0,061 y una significación asociada $p = 0,200$ ($p > \alpha$), por lo que se concluye que las concentraciones de hierro se distribuyen normalmente en la muestra seleccionada.

Se presenta el histograma de frecuencia de los valores de hierro determinados en la muestra (Figura).

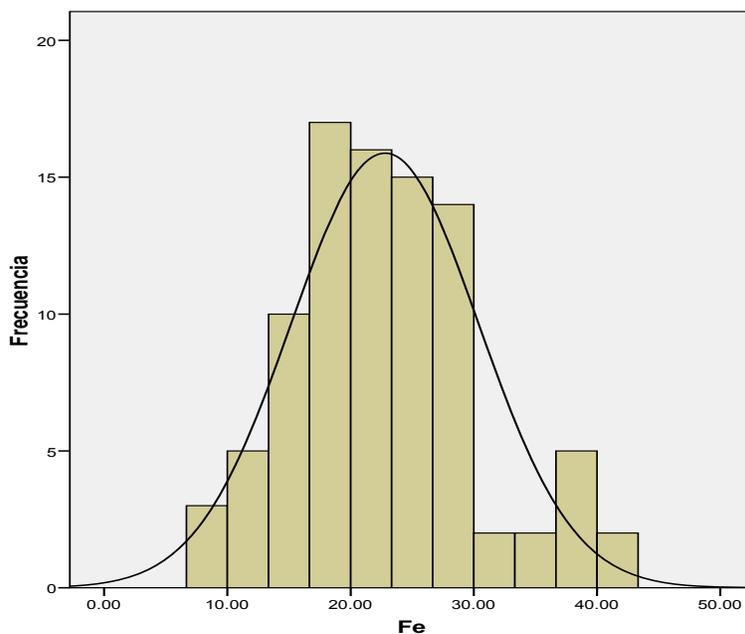


Figura Histograma de frecuencia de los valores de hierro.

Se realizó una distribución de los valores de concentración de Fe según el sexo. Los resultados de la estadística descriptiva para ambos grupos aparecen en la siguiente tabla.

Tabla Estadígrafos descriptivos según sexo.

Grupos	Sexo femenino	Sexo masculino
Estadígrafos		
Número de casos	46	35
Valor máximo	39,98 $\mu\text{mol/l}$	42,59 $\mu\text{mol/l}$
Valor mínimo	7,11 $\mu\text{mol/l}$	7,77 $\mu\text{mol/l}$
Media	22,97 $\mu\text{mol/l}$	22,78 $\mu\text{mol/l}$
Desviación típica	7,58 $\mu\text{mol/l}$	8,20 $\mu\text{mol/l}$

Para los dos grupos se comprobó la distribución normal, en este caso mediante la prueba de Shapiro-Wilk, y se encontró en ambos una $p > 0,05$. Para demostrar si existen o no diferencias significativas entre las medias calculadas para ambos sexos, se realizó una prueba de hipótesis, y se calculó la t de Student para dos muestras independientes, teniendo en cuenta el presupuesto de normalidad. El valor del estadígrafo fue de 0,107 y la significación asociada 0,915. Se concluye que no existieron diferencias significativas entre los valores de hierro de recién nacidos hembras y varones.

Discusión

El intervalo de referencia determinado en las condiciones de trabajo del laboratorio de la UNIB con este método, muestra valores cercanos al rango establecido por el fabricante del juego de reactivos empleado (8,95 $\mu\text{mol/l}$ a 30 $\mu\text{mol/l}$), aunque se comprobó una diferencia en el límite inferior, que en este caso queda por encima del publicado. Para entender esta diferencia, se deben tener en cuenta varios factores.

Se trata de una matriz diferente, es decir, la muestra no es sangre de adulto, sino de cordón umbilical, que posee características propias. La placenta y el cordón umbilical constituyen la unión primaria entre el feto y la madre. Al final de su desarrollo, el cordón umbilical presenta dos arterias y una vena; la vena contiene sangre arterial y las dos arterias, de menor calibre, conducen sangre venosa del feto a la placenta. La toma de muestra se obtiene mediante el drenaje por gravedad de la placenta, con esta aún dentro del útero, por lo que la muestra contiene una mezcla de sangre arterial y venosa¹⁷. Esto implica diferencias en cuanto a pH, gases disueltos en sangre, y concentraciones de diferentes metabolitos, que podrían interferir en el resultado de la determinación.

En la muestra estudiada, no se encontraron madres con anemia grave; todas las incluidas recibieron atención médica durante el embarazo y tomaron suplementos adicionales de hierro y vitaminas (tableta prenatal). En la mayoría de los mamíferos se ha podido establecer que el hierro fetal es derivado de la transferrina materna. A menos que sea extrema, la deficiencia de hierro de la madre no afecta la dotación férrica del feto, el organismo materno establece como destino preferencial el abastecimiento al nuevo organismo en formación.

La cantidad de hierro que atraviesa la placenta depende de dos factores: el número de receptores de transferrina en el extremo apical de la célula y los niveles de ferritina disponibles; la velocidad de transporte depende de las necesidades del feto¹⁸. Cabe pensar, por tanto, que la dotación genética de la madre podría influir en la captación de hierro del feto, teniendo en cuenta la cantidad de receptores para la transferrina que se expresen en las células placentarias responsables de la incorporación de este elemento.

Las concentraciones séricas de hierro no difirieron significativamente entre recién nacidos hembras y varones en la muestra estudiada. Se conoce que los hombres poseen, como grupo, mayores reservas de hierro que las mujeres, pero la causa de esta diferencia está relacionada con las

pérdidas cíclicas de la menstruación y no concurren en los recién nacidos. En la literatura consultada no se encontró otra condición que relacionara al sexo con los niveles séricos de hierro, aunque sí se han descrito valores diferentes de ferritina sérica para los sexos en el período fetal/neonatal, específicamente se han informado valores superiores de esta proteína para el sexo masculino¹⁹. En todo caso, con respecto a la variable que se analiza en este estudio, nuestros resultados coinciden con lo esperado, por lo que puede validarse el intervalo propuesto para ambos sexos.

Summary

During the last years umbilical cord blood has been of scientific interest as a mean of obtaining blood sample in newborns, but also because it is a way of determining some parameters that offer a detailed information of their nutritional and metabolic state. Among the recognized techniques for the determination of iron, ferrozine method results accessible for developing countries like ours. In order to assure a correct interpretation of the results, it is necessary to establish iron reference values of this mineral, taking into account the specific conditions of analysis used. The objective of the current paper is to determine iron reference values in umbilical cord blood samples in newborns of "Mariana Grajales" Gynecobstetric Hospital, using an ultraviolet- visible spectrophotometry that uses ferrozine in work conditions of the Laboratory of Molecular Diagnostic of Biomedical Research Unit. 91umbilical cord blood samples were processed, and values were informed are in correspondence with the published ones in the literature. Statistically, the variable was studied presents a normal distribution for feminine and masculine newborns that is the reason why, the interval was reported is valid for both sexes.

Referencias bibliográficas

1. Demetrios Petropoulos MD, Kha Wah Chan MD. Umbilical Cord Blood Transplantation. Current Oncol Reports [Internet]. 2005 [citado 12 Nov 2008];7:[aprox. 3 p.]. Disponible en: <http://www.springerlink.com/content/n112181055677885/>
2. Bojanić I, Golubić Cepulić B. Umbilical cord blood as a source of stem cells. Acta Méd Croática [Internet]. 2006 Jun [citado 12 Oct 2008];60(3):[aprox. 10 p.]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16933834>
3. Siddappa AM, Rao R, Long JD, Widness JA, Georgieff MK. The assessment of newborn iron stores at birth: a review of the literature and standards for ferritin concentrations. Neonatology. 2007 Jan [citado 12 Nov 2008];92(2):[aprox. 9 p.]. Disponible en: www.online.karger.com/ProdukteDB/produkte.asp
4. Otero S, del Río MC. Hierro. En: Cocho JA, Escanero JF, Buitrago JM. Elementos traza: aspectos bioquímicos, analíticos y clínicos. España: Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; 1998.
5. Zhang AS, Enns CA. Iron homeostasis: recently identified proteins provide insight into novel control mechanisms. J Biol Chem. 2009 Jan [citado 12 Ene 2010];284(2):[aprox. 4 p.]. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18757363
6. Zhang AS, Enns CA. Molecular mechanisms of normal iron homeostasis. Am Soc Hematol: Educ Program Hematology. 2009 [citado 12 Ene 2010]; 2009: [aprox. 7 p.]. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20008200
7. Lee GR, Herbert V. Nutritional factors in the production and function of erythrocytes. En: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Mc Rogers G, editors. Wintrobe's clinical hematology. 10th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. p. 243-54.
8. Uberos Fernández J. Influencia del perfil férrico gestacional en la ferropenia del lactante [Internet]. Sociedad española de Pediatría extrahospitalaria y Atención Primaria; 2008 Nov [citado 18 Ene 2010]. Disponible en:

- <http://www.sepeap.org/archivos/revisiones/hematologia/ferropenia.htm>
9. Hay G, Refsum H, Whitelaw A, Melbye EL, Haug E, Borch-Johnsen B. Predictors of serum ferritin and serum soluble transferrin receptor in newborns and their associations with iron status during the first 2 years of life. *Am J Clin Nutr.* 2007 Jul [citado 12 Nov 2008];86(1):[aprox. 9 p.]. Disponible en:
<http://www.ajcn.org/cgi/content/abstract/86/1/64>
 10. Chaparro CM. Setting the Stage for Child Health and Development: Prevention of Iron Deficiency in Early Infancy. American Society for Nutrition. *J Nutr.* 2008 Dic [citado 18 Ene 2010];138(12):[aprox. 5 p.]. Disponible en:
<http://jn.nutrition.org/cgi/content/full/138/12/2529>
 11. Fischer R, Harmatz PR. Non-invasive assessment of tissue iron overload. *Hematology [Internet]* 2009 [citado 18 Ene 2010];2009:[aprox. 6 p.]. Disponible en:
<http://asheducationbook.hematologylibrary.org/cgi/content/full/2009/1/215>
 12. Koulaouzidis A, Said E, Cottier R, Saeed AA. Soluble transferrin receptors and iron deficiency, a step beyond ferritin. A systematic review. *J Gastrointest Liver Dis.* 2009 Sep [citado 18 Ene 2010];18(3):[aprox. 7 p.]. Disponible en:
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19795030?itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum&ordinalpos=1&log\\$=free](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19795030?itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum&ordinalpos=1&log$=free) y en:
http://www.jgld.ro/32009/32009_13.pdf
 13. Dick A, Ford R. Cholinergic and oxidative stress mechanisms in sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr [Internet]*. 2009 Nov [citado 18 Ene 2010];98(11):[aprox. 7 p.]. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2773533/?tool=pubmed>
 14. Khrycheva AD. Application of photothermal deflection spectroscopy for the determination of iron(II) with ferrozine with sorption preconcentration on Silufof. *Eur Phys J Special Topics [Internet]*. 2008 Ene [citado 18 Ene 2010];153(1):[aprox. 3 p.]. Disponible en:
<http://www.springerlink.com/content/133418q089x58031/>
 15. Norma cubana: (NC- ISO 15189:2008) Laboratorios clínicos-requisitos particulares para la calidad y desempeño. Anexo C9. ICS: 03.120.10. 2da ed. (Enero 2008).
 16. HELFA Diagnósticos. Hierro en suero. La Habana: Suministrador EPB "Carlos J. Finlay"; 2007.
 17. Salazar Torres L. Cuantificación de inmunoglobulinas y proteínas del sistema del complemento en sangre del cordón umbilical en Villa Clara [Tesis]. Villa Clara: Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara; 2009.
 18. Bioquímica Perinatal [Internet]. Curso Básico Anemias nutricionales. Pontificia Universidad Javeriana. 2004 [actualizado 11 Ene 2004; citado 20 Ene 2010]. Disponible en:
<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/perinatal/anemiasnutricionalesed.html>
 19. Siddappa AM, Rao R, Long JD, Widness JA, Georgieff MK. Evaluación de depósitos de hierro del neonato al nacer: revisión de la literatura y estándares para concentraciones de ferritina. *Neonatology [Internet]*. 2007 Jul [citado 18 Ene 2010];92:[aprox. 9 p.]. Disponible en:
www.prematuros.cl/webjulio07/Hierro/fierro.htm

Recibido: 6 de enero de 2011

Aprobado: 20 de febrero de 2011