

Cuantificación de hierro hepático por espectrometría de absorción atómica con vaporización electrotérmica*

Iron liver quantification using electrothermal atomic absorption spectrometry

Quantificação de ferro hepático por espectrometria de absorção atômica com vaporização eletrotérmica

► María Angélica Véliz^{1b,c}, María del Pilar Balverdi^{2a}, Roberto Roque Rodríguez^{3c,d}, Federico Guillermo Villamil^{4c,e}, Adriana Sales^{5a,c}

¹ Bioquímica

² Farmacéutica

³ Especialista en Gastroenterología

⁴ Especialista en Hepatología y Trasplante hepático

⁵ Dra. en Química

^a Instituto de Química Analítica. Facultad de Bioquímica, Química y Farm. UNT.

^b Instituto de Física. Facultad de Bioquímica, Química y Farm. UNT.

^c Especialización en Hepatología. Facultad de Bioquímica, Química y Farm. UNT.

^d Departamento de Clínica Médica. Facultad de Medicina. UNT.

^e Hospital Británico de Buenos Aires.

* Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. Ayacucho 471. S.M. de Tucumán. CP 4000. Tucumán. Argentina.
E-mail: pupibio@fbqf.unt.edu.ar; pupiveliz@hotmail.com

Abreviaturas usadas en este trabajo: Fe, hierro; ET AAS, Espectrometría de Absorción Atómica con Vaporización Electrotérmica; NTBI, *non-transferrin bound iron*; Tf, transferrina; HH, hemocromatosis hereditaria; HCV, hepatitis crónica por virus C; EHA, enfermedad hepática alcohólica; EHGNA, enfermedad de hígado graso no alcohólico; SQUID, suceptometría magnética; RMN, resonancia magnética nuclear; UNT; Universidad Nacional de Tucumán; LABRTA, Laboratorio de Análisis Químicos de Trazas; HNO₃, ácido nítrico; H₂O₂, agua oxigenada; LD, Límite de Detección; LC, Límite de Cuantificación; CHH, concentración de hierro hepática; HS, hígado sano; HE, hígado enfermo; II, *Iron Index* o índice de hierro; DRC-ICP-MS, *Dynamic Reaction Cell-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*; IRM; imágenes de resonancia magnética; AASLD, *American Association for the Study of Liver Diseases*; AGA, *American Gastroenterological Association*.

Resumen

Se estudió el depósito de hierro (Fe) en tejido hepático de individuos sanos y de individuos con enfermedades crónicas del hígado, siendo todos adultos entre 46 y 70 años. La cuantificación de hierro se realizó mediante la técnica de Espectrometría de Absorción Atómica con Vaporización Electrotérmica (ET AAS). Las muestras de hígado obtenidas por biopsia hepática fueron pesadas y sometidas a digestión ácida. Simultáneamente se realizaron ensayos de recuperación del analito fortificando las muestras y el blanco de reactivo con el agregado de un estándar de Fe. La cuantificación se realizó mediante una curva de calibración (con estándares entre 10 y 50 µg/L). Se midieron áreas de pico a 248,3 nm usando como fuente una lámpara de cátodo hueco. Los resultados obtenidos de las muestras correspondientes a individuos sanos fueron inferiores a 1.000 µg/g de tejido seco, mientras que los valores correspondientes a individuos con enfermedades crónicas del hígado resultaron superiores, entre 1.800 y 7.835 µg/g de tejido seco.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Se observó una relación directa entre la concentración de hierro en tejido hepático y el grado de depósito de este metal, por lo que el desarrollo de la metodología ET AAS permitió cuantificar la sobrecarga de hierro y estimar los valores obtenidos asociados a diferentes hepatopatías.

Palabras clave: hierro * sobrecarga de hierro * hígado * espectrometría de absorción atómica

Summary

The iron (Fe) deposit was studied in the liver tissue of healthy and chronic liver disease subjects, all of them adults aged 46 to 70. The iron quantification was made by electrothermal atomic absorption spectrometry (ET AAS). Biopsy liver samples were weighed, measured, and put under acid digestion. Simultaneously a test was performed to analyze recovery in both strong samples and bound reagents with the addition of a standard of iron. Quantification was carried out using a calibration curve (from 10 to 50 µg/L): Peak areas of 248.3 nm were measured through a hollow cathode lamp. The results of the samples for healthy individuals were less than 1,000 µg/g of dry tissue, while the range in subjects with chronic liver disease was higher, (range from 800 to 7,835 µg/g dry tissue). There is a direct relationship between concentrations of iron in liver tissue and the range of the metal deposit for which reason development of the ET AAS methodology made it possible to quantify the iron overload and estimate the values associated to the different hepatopathies.

Key words: iron * iron overload * human liver * atomic absorption spectrometry

Resumo

Foi estudado o depósito de ferro (Fe) em tecido hepático de indivíduos saudáveis e de indivíduos com doenças crônicas do fígado, sendo todos adultos entre 46 e 70 anos. A quantificação de ferro foi realizada através da Técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com Vaporização Eletrotérmica (ET AAS). As amostras de fígado obtidas por biópsia hepática foram pesadas e submetidas à digestão ácida. Simultaneamente foram realizados testes de recuperação do analito fortificando as amostras e o branco de reagente com o acréscimo de um padrão de Fe. A quantificação foi realizada através de uma curva de calibragem (com padrões entre 10 e 50 µg/L). Mediram-se áreas de pico a 248,3 nm usando como fonte uma lâmpada de cátodo oco. Os resultados obtidos das amostras correspondentes a indivíduos sadios foram inferiores a 1.000 µg/g de tecido seco, e os valores correspondentes a indivíduos com doenças crônicas do fígado resultaram superiores, entre 1.800 a 7.835 µg/g de tecido seco. Foi observada uma relação direta entre a concentração de ferro em tecido hepático com o grau de depósito deste metal, pelo qual o desenvolvimento da metodologia ET AAS permitiu quantificar a sobrecarga de ferro e calcular os valores obtidos associados a diferentes hepatopatias.

Palavras chave: ferro * sobrecarga de ferro * fígado * espectrometria de absorção atômica

Introducción

El hierro (Fe) es un elemento imprescindible para la vida. Ingresa al organismo con el sustento diario en cantidad variable, según el alimento y el hábito dietético. En Argentina el 41% del Fe aportado es de origen animal, y en el suministro de alimentos su contenido medio por día y por persona es de 17,2 mg (1). Las carnes, las aves del corral, los pescados y mariscos son alimentos que favorecen la biodisponibilidad del Fe igual que ciertas bayas, las que además por su contenido en ácidos *p*-cumarínico, clorogénico, oleico, linoleico, pantoténico, y salicílico, poseen propiedades anticancerosas (2).

En condiciones de salud se absorben a nivel intestinal de 1 a 2 mg de Fe diario y la misma cantidad

se pierde por exfoliación celular, por transpiración, orina y micro sangrado fisiológico intestinal. Sin embargo, y gracias a la capacidad del organismo de reutilizar el Fe presente, la demanda del mismo es mínima (3).

Un adulto normal, en equilibrio nutricional, tiene un contenido total de hierro de cerca de 4,0 g. Aproximadamente 3,0 g circulan por la sangre, en su mayor parte como hemoglobina en los glóbulos rojos y en menor proporción unido a la transferrina (Tf) y alrededor de 0,8 a 1,2 g se encuentra en depósitos tisulares unido principalmente a la ferritina y menos a la hemosiderina (4).

El cuerpo humano carece de una vía natural de eliminación de Fe, por lo tanto, en situaciones de exceso del metal se expresa una sobrecarga del mismo en los órganos de almacenamiento, principalmente en hígado,

y un incremento en sangre. En estas circunstancias la Tf alcanza su techo de saturación (100%), y el exceso de Fe puede unirse al citrato u otros ligandos para formar el *pool* de hierro no unido a Tf (NTBI, *non-transferrin bound iron*) (4).

Existen diversas enfermedades hepáticas como Hemocromatosis Hereditaria (HH) relacionada a mutaciones del gen HFE, en menor grado hemocromatosis no relacionada al gen, hemocromatosis juvenil, hepatitis crónica por virus C (HCV), enfermedad hepática alcohólica (EHA), enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) y otras que histológicamente cursan con una sobrecarga de hierro en el hígado (5). La HH eventualmente se manifiesta con impotencia, artralgia, trastornos cardíacos, diabetes y la mayoría puede desarrollar fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma celular (6), situaciones que introducen un cambio sustancial en el manejo y pronóstico de la enfermedad (7). Estudios poblacionales en Argentina reflejan la prevalencia de algunas de ellas como la esteatosis hepática en la provincia de Tucumán (8), la hepatitis HCV en la provincia de Salta con una prevalencia del 3,32% y en Capital Federal con un 5,6% (9).

La cuantificación del hierro en tejido hepático y su posible asociación con otras variables estudiadas contribuiría tanto con el pronóstico como con el diagnóstico diferencial entre diversas hepatopatías que cursan con sobrecarga de hierro en hígado, como así también serviría para evaluar el monitoreo de pacientes durante un tratamiento con quelantes de hierro o de pacientes sometidos a flebotomía (10).

Las determinaciones en sangre más frecuentes tales como hierro sérico, saturación de transferrina y ferritina, evalúan en forma indirecta la sobrecarga férrica. El indicador más usado es Fe sérico, considerando que expresa el nivel de Fe circulante, pero por factores fisiológicos y patológicos que lo afectan presenta rangos referenciales amplios. Weisstaub, *et al.* expresaron igual concepto al referirse a la determinación del zinc en plasma, introduciendo en tal caso la cuantificación del metal en eritrocitos por espectrometría de absorción atómica y su relación en suero (11).

Actualmente se puede recurrir a otros métodos como la suceptometría magnética (SQUID) y resonancia magnética nuclear (RMN), además del método de referencia que es a través de biopsia hepática (12). En caso de un homocigoto C282Y, el estudio genético prima frente a la biopsia hepática para el diagnóstico de la hemocromatosis hereditaria (13) (14).

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método analítico para la determinación directa de la concentración de hierro en muestras de hígado humano mediante la técnica de Espectrometría de Absorción Atómica con Vaporización Electrotérmica - ETAAS (del inglés, *Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*).

Materiales y Métodos

Población: Se estudiaron treinta adultos, seleccionados y calificados en dos grupos no aleatorios y apareados por edad y sexo, de los cuales quince eran pacientes con diagnóstico confirmado de enfermedad crónica del hígado, y los quince restantes eran pacientes con hígado sano que llegaron a cirugía abdominal por diferentes patologías no hepáticas. El trabajo fue realizado acorde a las Normas Éticas Internacionales y con consentimiento informado por escrito y bajo firma de los sujetos involucrados con garantía de anonimato y confidencialidad. Se tuvo en cuenta: el tipo de ocupación laboral (trabajo en minas de hierro, con asbestos, soldar o pulir aceros, pintar con polvos de óxido de hierro) y el hábito de fumar (por el contenido de hierro en el humo inhalado). Ambas condiciones ocasionalmente pueden generar exceso de hierro en el organismo. Se consideraron criterios de:

Inclusión: adultos sin enfermedad hepática y con hepatopatías crónicas.

Respecto a los primeros, se incluyeron a aquellos con ausencia de signos y síntomas clínicos de enfermedad hepática, con hepatograma reiteradamente normal (mínimo en 2 instancias respetando la vida media de cada parámetro), con marcadores virales, inmunológicos y tumorales negativos y sin antecedentes de hábitos tóxicos (drogas y alcohol). Los pacientes con enfermedad crónica de hígado presentaron diagnóstico confirmado clínicamente, mediante marcadores de laboratorio, ecografía y/o histología hepática.

Exclusión: neonatos, niños y adolescentes menores de 21 años y embarazadas. No entraron en el presente estudio individuos tratados con suplementos dietarios de Fe, con politraumatismos, transfusiones recientes (anemias aplásicas), con talasemias (aumento de absorción de Fe y aumento de eritropoyesis), con enfermedades hereditarias como aceruloplasminemia, atransferrinemia, enfermedad de la ferroportina, y tirosinemia hereditaria. Individuos que se negaron a participar en el presente estudio.

Muestras: tejido hepático obtenido mediante biopsia de hígado y recolectado en recipiente de teflón tarado y con formol. Las etapas sucesivas y secuenciales desde la toma de muestra hasta la determinación del análisis fueron cuidadosamente realizadas evitando tanto la contaminación como la pérdida de analito.

Se trabajó en un laboratorio especial para el análisis de trazas y ultratrazas de presión positiva con insuflador de aire ultrapuro perteneciente a la Universidad Nacional de Tucumán (Laboratorio de Análisis Químicos de Trazas- LABRTA-UNT), dedicado a docencia, investigación y servicios al medio. El tratamiento de las

muestras se realizó dentro de una campana de flujo laminar vertical, la pesada en balanza analítica dentro de una campana de flujo laminar horizontal; los reactivos usados fueron ultrapuros y para las diluciones se utilizó agua destilada y desionizada 18 M Ω /cm obtenida de NANO pure (Barnstedt, IA, EE.UU.). Para la disolución de tejidos existen diversos métodos en los que se usan reactivos orgánicos (15). Sin embargo, se prefirió ensayar una digestión con ácido nítrico Merck (Darmsatdt, Alemania), p.a., 65%, bidestilado en sub-boiling y almacenado en botella de teflón descontaminada, más agua oxigenada de 100 vol. Cicarelli, p.a.; se obtuvieron buenos resultados. En una balanza analítica Mettler-Toledo AG 245, sensibilidad $\pm 0,1$ mg, se pesaron las muestras (en el orden de 100 mg) -secadas en estufa a 90 °C durante 5 horas- en recipientes de teflón, descontaminadas y taradas. Se agregó 1 mL de HNO₃ (concentrado y bidestilado) y 1 mL de H₂O₂ (100 vol) a cada muestra. Se calentaron a 125 °C durante 2 h en placa calefactora y dentro de una campana de flujo laminar para ayudar a la digestión completa. Se dejaron enfriar y se llevaron a volumen con agua destilada y desionizada a 10 mL en matraz aforado calibrado. Paralelamente se realizó la preparación de un blanco de reactivo constituido por 1 mL de HNO₃ y 1 mL de H₂O₂ sometidos al mismo tratamiento y llevados a volumen de 10 mL en matraz aforado con destilada y desionizada. Simultáneamente se realizaron ensayos de recuperación del analito con fortificaciones de hierro a las muestras, antes y después del tratamiento químico. Se agregaron 20 μ g/L de estándar de Fe a una porción de muestra ya secada que luego fue sometida a digestión. La misma cantidad de Fe se agregó a una alícuota de la solución de muestra antes de la lectura.

Análisis de Fe por ETAAS: El equipo usado fue el Espectrómetro de absorción atómica Perkin-Elmer (Norwalk, CT, EE.UU.), Analyst 100, con horno de grafito HGA-800, autosampler AS-72, del laboratorio LABRTA-UNT. Las determinaciones de hierro se realizaron en tubos de grafito con plataforma pirolítica integrada (Part. N° B3000407 Perkin-Elmer). Se optó por usar el programa de temperaturas sugerido por el fabricante luego de verificar que eran las condiciones óptimas para el trabajo. El programa de secado se inició con un calentamiento a 100 °C (*ramp time* 10s y 20s de *hold time*) y luego a 160 °C (*ramp time* 5s y 20s de *hold time*). La temperatura de pirólisis usada fue de 1200 °C, mientras que la temperatura de atomización de 2400 °C, enfriando antes de la atomización a 20 °C (15 s). Se usó gas Ar como purga a 250 mL/min. Como modificador de matriz se incorporaron 5 μ L (0,05 mg) de la solución de nitrato de magnesio 10.000 mg.L⁻¹, (Part. N° BO190634, Perkin Elmer); y para corrección de fondo una lámpara de deuterio. Todos los parámetros fueron optimizados hasta obtener las mejores señales para el analito.

La cuantificación se realizó mediante una curva de calibración con estándares de 10, 12,5; 20; 25; 37,5 y 50 μ g/L. La curva fue construida a partir de la solución estándar de hierro, 1000 mg.L⁻¹. Merck, Certif. pure, por dilución de la solución de 50 μ g/L automáticamente con el *autosampler*. Se midieron áreas de pico a 248,3 nm usando lámpara de cátodo hueco como fuente emisora de radiación electromagnética de longitud de onda del rango de la línea de resonancia del Fe. Se usó como blanco de calibración solución de HNO₃ 5%. Se aplicó un análisis de regresión no lineal mediante el *software* del equipo obteniendo un coeficiente de correlación de 0,9967. El volumen inyectado fue de 20 μ L, tanto para el blanco, las soluciones de calibración y las muestras. Algunas muestras fueron diluidas 1+ 999 con el HNO₃ 5% mientras que para otras no fue necesaria la dilución. Todas las determinaciones, incluidas las correspondientes a las diluciones, se realizaron por triplicado.

Validación del método: Para la técnica desarrollada se obtuvo un límite de detección (LD) igual 1 μ g/L, mientras que el límite de cuantificación (LC) dio igual a 3 μ g/L calculados en base a la curva de calibración (16). Como control interno de la calibración se usó una solución estándar de Fe de 20 μ g/L, obtenida a partir de una solución estándar de hierro, 1000 mg.L⁻¹. Merck, Certif. pure, obteniéndose errores del 12%, valor adecuado para esta técnica. El valor de la masa característica teórica (mc) es de 5 pg, estando los valores experimentales entre 4-6 pg. Para evaluar la exactitud se realizaron ensayos de recuperación. Se obtuvieron valores promedio de recuperación de analito del 78%, para las muestras fortificadas antes de la digestión con lo que se evaluaron las posibles pérdidas o contaminación en el tratamiento químico. Por otro lado, los promedios de recuperaciones para muestras fortificadas después de la digestión dieron igual a 85%, evaluando así el efecto de la matriz en las mediciones de analito. Como este valor está dentro de lo aceptable (17), se descartaron las posibles interacciones analito-matriz que pudieran afectar las mediciones. Para demostrar la validez del método ET AAS para la determinación de Fe en hígado se usó el método de adición estándar que es aceptado como método de validación (18).

La precisión se evaluó en término de repetitividad obteniendo valores del 2%, mientras que la reproducibilidad aumentó a 3%.

Resultados

La concentración de hierro hepática (CHH) en las muestras correspondientes a individuos con hígado sano, presentó valores inferiores a 1.000 μ g/g de tejido seco, con un valor promedio de 356 μ g/g de tejido seco;

mientras que aquellas muestras provenientes de individuos con hígado enfermo (HE) por diversas hepatopatías crónicas dieron CHH entre 1.800 a 7.835 µg/g de tejido seco, con un valor promedio de 3.447 µg/g de tejido seco.

Se determinó en forma estadística que sí existe diferencia significativa entre los promedios de Fe en hígados sanos (HS) y en hígados enfermos (HE), mediante la aplicación del *test t* (19). Los valores obtenidos se indican en la Tabla I.

Tabla I. Concentración de Fe tisular en sujetos con hígado sano (HS) y sujetos con hígado enfermo (HE). Valor promedio y desvío estándar (2S para 95% de confianza)

Muestra	Fe (µg/g)± 2DE	Muestra	Fe (mg/g)± 2 DE
HS1	323±6	HE1h	4.590±90
HS2	441±8	HE2h	7.835±198
HS3	234±5	HE3h	5.221±102
HS4	298±6	HE4h	6.072±120
HS5	523±11	HE5h	6.500±151
HS6	302±4	HE6o	1.920±35
HS7	410±5	HE7o	2.123±42
HS8	309±9	HE8o	2.904±55
HS9	287±3	HE9o	3.066±61
HS10	312±3	HE10cc	1.803±35
HS11	500±12	HE11cc	1.944±44
HS12	338±7	HE12cc	2.050±68
HS13	421±9	HE13v	1.966±40
HS14	346±6	HE14v	1.821±36
HS15	291±3	HE15v	1.885±35

En la Tabla II se muestra la relación encontrada entre los valores de Fe y las diversas enfermedades hepáticas crónicas estudiadas, correspondiendo la concentración máxima a la enfermedad hemocromatosis y valores menores a las otras enfermedades no hemocromatósicas (esteatosis alcohólica, cirrosis criptogénica y hepatitis por virus C).

Se obtuvo una diferencia significativa en la sobrecarga hepática de hierro entre la hemocromatosis y las crónicas no hemocromatósicas con un promedio para la primera de 6.044 µg/g de tejido seco, y para las últimas de 2.148 µg/g de tejido seco.

Se determinó el índice de hierro o *Iron Index (II)* mediante el cociente aritmético entre la concentración de Fe expresada en µmol/g de peso seco y la edad del paciente.

En individuos con hígado sano, el *II* arrojó valores inferiores a 0,17, con un valor promedio de 0,12; a diferencia de los individuos con hígado enfermo (HE) el *II* estuvo entre 0,54 a 2,34, con un valor promedio de 1,21.

Los valores obtenidos se indican en la Tabla III.

Tabla II. Concentración de Fe tisular en sujetos con diferentes enfermedades crónicas del hígado

Muestra	Fe (µg/g)	Enfermedad
HE1h	4.590	Hemocromatosis
HE2h	7.835	Hemocromatosis
HE3h	5.221	Hemocromatosis
HE4h	6.072	Hemocromatosis
HE5h	6.500	Hemocromatosis
HE6o	1.920	Esteatosis Alcohólica
HE7o	2.123	Esteatosis Alcohólica
HE8o	2.904	Esteatosis Alcohólica
HE9o	3.066	Esteatosis Alcohólica
HE10c	1.803	Cirrosis criptogénica
HE11c	1.944	Cirrosis criptogénica
HE12c	2.050	Cirrosis criptogénica
HE13e	1.966	Hepatitis viral C
HE14e	1.821	Hepatitis viral C
HE15e	1.885	Hepatitis viral C

Tabla III. Índice de Fe en sujetos con hígado sano (HS) y con hígado enfermo (HE)

Muestra	II	Muestra	II
HS1	0,09	HE1h	1,66
HS2	0,13	HE2h	2,34
HS3	0,06	HE3h	1,87
HS4	0,08	HE4h	1,98
HS5	0,15	HE5h	2,15
HS6	0,12	HE6o	0,79
HS7	0,17	HE7o	0,69
HS8	0,08	HE8o	1,08
HS9	0,09	HE9o	1,19
HS10	0,14	HE10cc	0,69
HS11	0,17	HE11cc	0,54
HS12	0,09	HE12cc	0,77
HS13	0,11	HE13v	0,82
HS14	0,15	HE14v	0,78
HS15	0,13	HE15v	0,81

En la Tabla IV se muestra la relación encontrada entre los valores del índice de hierro (*II*) y las diferentes enfermedades hepáticas crónicas estudiadas, correspondiendo el valor máximo a la enfermedad hemocromatosis y valores menores a las otras enfermedades hepáticas no hemocromatósicas. Se evidenció que sí existe diferencia significativa entre los promedios de índice de Fe en hígados sanos y en hígados con hemocromatosis, con un valor de 0,12 para los primeros y de 2,00 para los últimos.

Tabla IV. Índice de Fe (II) en sujetos con diferentes enfermedades crónicas del hígado

Muestra	II	Enfermedad
HE1h	1,66	Hemocromatosis
HE2h	2,34	Hemocromatosis
HE3h	1,87	Hemocromatosis
HE4h	1,98	Hemocromatosis
HE5h	2,15	Hemocromatosis
HE6o	0,79	Esteatosis Alcohólica
HE7o	0,69	Esteatosis Alcohólica
HE8o	1,08	Esteatosis Alcohólica
HE9o	1,19	Esteatosis Alcohólica
HE10c	0,69	Cirrosis criptogénica
HE11c	0,54	Cirrosis criptogénica
HE12c	0,77	Cirrosis criptogénica
HE13e	0,82	Hepatitis viral C
HE14e	0,78	Hepatitis viral C
HE15e	0,81	Hepatitis viral C

Discusión

Actualmente no existe un método para cuantificar hierro tisular que simultáneamente reúna todas las características como precisión, exactitud, sensibilidad y sea económico y no invasivo (20). Según el Consenso Internacional de Hemocromatosis, la medida de concentración de hierro en biopsia hepática se considera como el método de referencia (21) y representa el “estándar de oro” para el diagnóstico de fibrosis y cirrosis (12) (22). No obstante, se revisaron los riesgos de la biopsia hepática resultando del 1% al 6% un leve sangrado post biopsia y una ínfima mortalidad asociada a complicación de menos de 1: 10.000 (23).

La cuantificación de hierro en tejido hepático ha sido realizada por diversos profesionales, ya en el campo de la investigación como en el de la bioquímica clínica, empleando diferentes métodos y técnicas.

En el Laboratorio de Medicina y Patología de la Clínica Mayo en Rochester (EE.UU.) se lo cuantificó por espectrometría de masas con la técnica *Dynamic Reaction Cell-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry* (DRC-ICP-MS). Expresaron valores referenciales de Fe hepático para adulto masculino (200-2.400) $\mu\text{g/g}$ peso seco y adulto femenino (400-1.600) $\mu\text{g/g}$ peso seco. Relacionaron el diagnóstico de hemocromatosis a concentraciones de Fe hepático $> 10.000 \mu\text{g/g}$ de peso seco; valores $> 3.000 \mu\text{g/g}$ con estados de sobrecarga de hierro sin lesión celular y cirrosis; y los valores mayores que el rango de referencia lo asociaron con talasemia, anemia sideroblástica, con hepatitis o cirrosis sin fibrosis significativa (24). Sin embargo, otros autores consideran

netamente patológica cuando la CHH en biopsia hepática supera los $100 \mu\text{mol/g}$ de tejido seco equivalente a $5.580 \mu\text{g/g}$ peso seco (20).

Antonello Pietrangelo publicó imágenes de resonancia magnética (IRM) de un hombre de 50 años de edad, con hemocromatosis HFE antes y después de la flebotomía, respectivamente. Antes del tratamiento expresó una CHH de $350 \mu\text{mol/g}$ de peso seco, momento en que la resonancia magnética reveló una enorme sobrecarga de hierro en el hígado y después de la remoción de hierro la intensidad de la señal se redujo a un valor de $35 \mu\text{mol/g}$ de peso seco (25).

Resultados similares publicaron José M. Alústiza *et al*, quienes entre el 2002 y 2006 cuantificaron el hierro hepático en 31 pacientes mediante RM de 1 Tesla (método del Dr. Gandon) y biopsia hepática. Según la concentración medida sobre biopsia hepática, 11 pacientes fueron normales ($< 36 \mu\text{mol.Fe/g}$ correspondiente a $2.008 \mu\text{g}$), 15 presentaron hemosiderosis ($36-80 \mu\text{mol.Fe/g}$) y 5 hemocromatosis ($> 80 \mu\text{mol.Fe/g}$). Concluyeron que el valor normal de la CHH es inferior a $36 \mu\text{mol.Fe/g}$. Valores mayores de $80 \mu\text{mol.Fe/g}$ ($4.464 \mu\text{g}$) son considerados como alta sobrecarga férrica, muy sugestiva de Hemocromatosis Hereditaria (26).

Fernández Salazar *et al*, biopsiaron 14 pacientes con ferritina superior a 300 ng/ml y/o índice de saturación de transferrina por encima del 45% para medir la CHH por espectrofotometría de absorción atómica. Consideraron como valor normal de hierro hepático $<25 \mu\text{mol/g}$ de tejido seco, o su equivalente $<1.395 \mu\text{g/g}$ de tejido seco (27).

Los resultados expresados en la bibliografía son difíciles de comparar si se tiene en cuenta que tanto los valores de referencia como el umbral crítico de hierro hepático, difieren de un autor a otro. En consecuencia, en la revista científica *Hepatology* del mes de julio del 2011, la Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades del Hígado (*American Association for the Study of Liver Diseases - AASLD*) y la Asociación Americana Gastroenterológica (*American Gastroenterological Association - AGA*), luego de realizar una revisión formal y un análisis de la literatura mundial, establecieron directrices y proporcionaron recomendaciones respecto a enfermedades con sobrecarga de hierro hepático (5). Establecieron que en adultos normales, los valores de referencia de hierro tisular varían entre 300 y $1.500 \mu\text{g/g}$ de tejido seco, valores equivalentes a $5-27 \mu\text{mol/g}$ de tejido seco. En cambio, para pacientes con Hemocromatosis Hereditaria (HH) asintomáticos los valores aumentan a un rango entre 2.000 y $10.000 \mu\text{g/g}$ de tejido seco, equivalente a $36-179 \mu\text{mol/g}$ de tejido seco. En el caso de pacientes con HH pero sintomáticos llegaron a considerar valores entre 8.000 y $30.000 \mu\text{g/g}$ de tejido seco, equivalente a $140-550 \mu\text{mol/g}$ de tejido seco.

El método espectrométrico para cuantificar Fe, desarrollado en el presente trabajo por la técnica de ETAAS y aplicado tanto en sujetos sanos como en pa-

cientes con HH, arrojó resultados que se ajustan a los rangos recomendados por la AASLD y AGA.

Por lo expuesto se sugiere este procedimiento para cuantificar el depósito de Fe en tejido hepático y como herramienta diagnóstica asociada a diversas hepatopatías que cursan con sobrecarga de hierro.

Conclusiones

La técnica de ETAAS resultó adecuada para la determinación de muy bajas concentraciones de analito presente en pequeñas cantidades de muestras como en el presente trabajo. Sin embargo, es importante destacar que las medidas de hierro en niveles tan bajos son muy propensas a la contaminación por lo que es indispensable disponer de un laboratorio adecuadamente acondicionado (ambiente aislado, insufladores de aire puro, campanas de flujo laminar para la digestión de muestras y pesadas y reactivos ultrapuros). Bajo estas condiciones se alcanzaron errores relativos porcentuales inferiores al 15%, valor apropiado para esta técnica, y precisiones del orden del 2%. Además, la técnica propuesta para el tratamiento químico arrojó valores de recuperación dentro de lo esperado (entre 70 y 130%).

La determinación de hierro mediante esta técnica permitió cuantificar en forma directa y valorar la concentración del analito en el tejido hepático.

Los valores promedios obtenidos en el presente trabajo demostraron diferencias estadísticamente significativas entre las cantidades de Fe para hígados sanos, con un rango entre 234 – 523 $\mu\text{g Fe/g}$ de tejido seco; y para hígados enfermos, con valores entre 1.803- 7.835 $\mu\text{g Fe/g}$ de tejido seco. Esto refleja una relación directa entre la cantidad medida y el grado de depósito tisular de hierro.

Los valores promedios del índice de hierro (*II*) presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con hígado sano, con un rango entre 0,06 – 0,17, y los enfermos con hemocromatosis con valores entre 1,66 - 2,34.

CORRESPONDENCIA

PROF. MARÍA A. VÉLIZ
Pasaje Gardel 40. Tafi Viejo
(4100) TUCUMÁN. Argentina
pupibio@fbqf.unt.edu.ar
pupiveliz@hotmail.com

Referencias bibliográficas

1. Human vitamin and mineral requirements. Report of a Joint WHO&FAO Expert Consultation. Rome: Food and Nutrition Division, FAO; 2002.
2. Rodríguez RR. Actualizaciones de Gastroenterología y Hepatología. Tucumán: Universidad Nacional de Tucumán; 2011.
3. Forrellat Barrios M, Gautier du Defaix Gómez H, Fernández Delgado N. Metabolismo del hierro. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 2000; 16 (3): 149-60.
4. Pérez G, Vittori D, Pregi N, Garbossa G, Nesse A. Homeostasis del hierro. Mecanismos de absorción, captación celular y regulación. Acta Bioquím Clín Latinoam 2005; 39 (3): 301-14.
5. Bacon BR, Adams PC, Kowdley KV, Powell LW, Tavill AS. Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. Hepatology 2011; 54(1): 328-43.
6. Stevens A, Lowe J. Anatomía Patológica. 2nd ed. Madrid (España): Harcourt Publishers; 2001.
7. Wood MJ, Skoien R, Powell LW. The global burden of iron overload. Hepatol Int 2009; 3: 434-44.
8. Soria SM, Katz SL, Álvarez DF, Rodríguez RR, González MG, D'Angelo PJ, et al. Prevalencia de enfermedades hepáticas en una población rural de alta montaña: estudio clínico, bioquímico y ecográfico. Acta Gastroenterol Latinoam 2006; 36: 174-181.
9. Fassio E, Schroder T. Asociación Argentina para el Estudio de las Enfermedades del Hígado. Conclusiones del Consenso Argentino Hepatitis C 2007. Acta Gastroenterol Latinoam 2008; 38 (1): 56-74.
10. Alexander NM. Iron. Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry, Ed. Seiler, Sigel and Sigel, New York 1994, pp. 411.
11. Weisstaub AR, Menéndez AM, Montemerlo H, Pastene H, Piñeiro A, Guidoni ME, et al. Zinc plasmático, cobre sérico y zinc y cobre eritrocitarios en adultos sanos de Buenos Aires. Acta Bioquím Clín Latinoam 2008; 42(3): 315-23.
12. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis a new look at an old disease. N Engl J Med 2004; 350: 2383-3297.
13. Summers KM, Halliday JW, Powell LW. Identification of homozygous hemochromatosis subjects by measurement of hepatic iron index. Hepatology 1990; 12:20-25.
14. Clark P, Britton L, Powell LW. The Diagnosis and Management of Hereditary Haemochromatosis. Clin Biochem Rev 2010; 31(1): 3-8.
15. Subramanian, K. Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques. Spectrochimica Acta Part B 1996; 51: 291-319.
16. Sales AM, Rodríguez Areal MM, Marchisio, PF, Rodríguez MI, Sales LA. Implementación de una rutina para el control de calidad de un proceso de medida química. XXVII Jornadas IRAM Universidades. Santiago del Estero, Argentina. Octubre de 2007. <http://www.uniram.com.ar/Jornadas/XXVII/home.htm> (Fecha de acceso 12 de setiembre de 2011)
17. Rubinson KA, Rubinson JF. Análisis Instrumental. Madrid: Pearson Educación S.A, 2001. 872pp.
18. Prichard E, Mackay GM, Points J. Trace Analysis: A Structures Approach to Obtaining Reliable Results. The Royal Society of Chemistry, UK, 1996, p.38.

19. Miller NJ, Miller, JC. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4ta. Edición Madrid: Pearson Educación, SA.; 2002. 296pp.
20. Altés A, Remacha AF, Baiget M. Diagnóstico y Tratamiento de la Hemocromatosis. *Hematológica* 2002; 87 (1). XLIV Reunión Nacional de la AEHH y XVIII Congreso Nacional de la SETH. Programa Educativo.
21. EASL International Consensus Conference on Haemochromatosis. *J Hepatol* 2000; 485: 485-504.
22. Bassett ML, Hickman PE, Dahlstrom JE. The changing role of liver biopsy in diagnosis and management of haemochromatosis. *Pathology* 2011 Aug; 43(5): 433-9.
23. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med* 2001; 344: 495-500.
24. Hanley MM. Copper and Iron Liver Tissue Analysis: A Comprehensive Platform Comparison. PittCon 2008, New Orleans, Louisiana, March 2-7, 2008.
25. Pietrangelo A. Hemochromatosis: an endocrine liver disease. *Hepatology* 2007; 46 (4):1291-1301
26. Alústiza JM, Castiella Egurkiza A, Zapata E, Jáuregui Garmendia L, Gabilondo Aguirregabiria A, Paloc C. Cuantificación de la concentración de hierro en hígado mediante RM de 1 Tesla. *Radiología: Publicación oficial de la Sociedad Española de Radiología Médica* 2008; 50 (4): 303-7.
27. Fernández Salazar LI, Aller de la Fuente R, Velayos Jiménez B, González Hernández JM. Hígado graso no alcohólico, índices séricos de hierro y concentración hepática de hierro. *Gastroenterol Hepatol* 2005; 28 (6): 364-72.

Aceptado para su publicación el 9 de marzo de 2012