

## Anemia ferropénica

COORDINADORES: A. REMACHA. *Toledo*  
J.A. MUÑOZ. *Cádiz*

### Resumen del simposio

En el presente simposio se ha revisado varios temas actuales relacionados con la anemia ferropénica, todos ellos de gran importancia en el diagnóstico y tratamiento de la carencia de hierro.

La Dra. Martí ha tratado el tema de la anticoagulación y la anemia ferropénica. La tríada anticoagulación con acenocumarol, sangrado digestivo recurrente por angiodisplasia y anemia ferropénica rebelde al tratamiento es todo un reto, primero diagnóstico y muchas veces terapéutico, que lleva a situaciones límite de anemia en pacientes mayores con cardiopatías de base. Además, del uso de heparinas de bajo peso molecular, una de las posibles utilidades de los nuevos anticoagulantes orales pueden ser estas situaciones.

El Dr. Muñoz *et al.* han realizado una exhaustiva puesta al día del tratamiento oral y parenteral de la anemia ferropénica. Como ellos destacan es necesario primero un diagnóstico clínico-biológico adecuado y un diagnóstico etiológico eficiente de la anemia ferropénica. El tratamiento siempre será sustitutivo, comenzando por sales ferrosas, en la gran mayoría de los casos, con lo que se resolverá la anemia. En casos seleccionados tiene su papel el hierro endovenoso (intolerancia, falta de respuesta al hierro oral, etc.). Entre los nuevos preparados destaca la presencia del hierro carboximaltosa que permite usar dosis elevadas de hierro, en relación con la severidad de la anemia ferropénica.

Los Dres. Benavente y González han revisado un factor que desde hace un par de décadas se considera más y más en la ferropenia. Se trata de la infección gástrica por *Helicobacter pylori*, que también se relaciona con el déficit de vitamina B<sub>12</sub>. Se caracteriza por una anemia ferropénica que responde mal al hierro y que presentan intolerancia oral al hierro. Los autores han revisado los mecanismos fisiopatológicos que pueden llevar a la ferropenia en caso de infección por *Helicobacter pylori*.

Los Dres. Ramsey *et al.*, por último, han completado este simposio con una puesta al día de un tema nuevo. La anemia ferropénica no respondedora al Fe oral, el denominado IRIDA, esta enfermedad congénita se debe a una anomalía de la proteína matriptasa 2 (TMPPRS6). La han puesto en el contexto de otras anemias ferropénicas congénitas, para su diagnóstico diferencial, y nos han revisado este tipo serin-proteasas transmembrana y su posible mecanismo de acción hasta llevar a un aumento de la hepcidina, consecuencia de la falta de control de la matriptasa 2 sobre la hemojuvelina. Es un ejemplo magnífico de cómo lesiones moleculares en proteínas que hasta hace poco no se sabían su implicación en el metabolismo férrico están ensanchando nuestros conocimientos en la ferropenia. Conviene conocer esta enfermedad y tenerla en cuenta en enfermos jóvenes con ferropenia no explicada.

## ANEMIA FERROPÉNICA EN EL PACIENTE ANTICOAGULADO

E. MARTÍ SÁEZ

*Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona*

### Introducción

La anemia ferropénica es la alteración hematológica de mayor prevalencia a escala mundial. De ahí la importancia del diagnóstico y tratamiento adecuados<sup>1</sup>. Los grupos de mayor riesgo son los niños y las mujeres en edad fértil. Fuera de estos dos grupos la causa más frecuente de anemia ferropénica son las pérdidas sanguíneas por tubo digestivo. Se sabe que la anticoagulación aumenta el riesgo de hemorragia digestiva y, por tanto, de anemia ferropénica<sup>2,3</sup>.

Con el aumento de la población en riesgo y la demostración de su beneficio clínico, la utilización de forma crónica de fármacos anticoagulantes se ha visto incrementada de forma notable, con lo que han aumentado también las complicaciones hemorrágicas<sup>4</sup>. Los principales fármacos utilizados de forma crónica son los AVK. Su eficacia ha sido establecida por ensayos clínicos bien diseñados para la prevención primaria y secundaria del tromboembolismo venoso y como profilaxis en la fibrilación auricular o en portadores de válvulas cardíacas mecánicas<sup>5-8</sup>.

Una complicación mayor del tratamiento anticoagulante y en concreto, del tratamiento con antagonistas de la vitamina K (AVK) es el sangrado. La hemorragia gastrointestinal es el tipo de sangrado más frecuente en pacientes tratados con estos fármacos. El riesgo de hemorragia digestiva alta es tres veces mayor en pacientes que reciben AVK<sup>3</sup>. Diversos factores influyen en el mayor riesgo de sangrado. El más importante es la intensidad del tratamiento anticoagulante<sup>4,8,9</sup>. Otros factores de riesgo son la edad avanzada, el uso concomitante de otros fármacos, como los antiinflamatorios no esteroideos o la aspirina, y la comorbilidad<sup>8-10</sup>. Algunos autores han evaluado el impacto del tratamiento anticoagulante en la recidiva de los episodios hemorrágicos y concluyen que el tratamiento anticoagulante no sólo es un factor de riesgo para el primer episodio hemorrágico, sino que los pacientes anticoagulados tienen un elevado riesgo de recidiva<sup>12,13</sup>.

Es difícil calcular el número total de pacientes en tratamiento crónico con estos fármacos, pero su número va en aumento. Se calcula que en España hay aproximadamente unos 600.000 pacientes en tratamiento crónico con AVK. La edad y la presencia de comorbilidad en estos pacientes también ha aumentado, lo que supone un incremento de las complicaciones hemorrágicas<sup>14</sup>.

### Causas de hemorragia digestiva recurrente y de origen oscuro

La hemorragia digestiva en pacientes anticoagulados es un problema asistencial importante, ya que tiene una elevada morbimortalidad y se trata de una situación de difícil manejo, por la necesidad de ingreso y atención hospitalaria frecuente, la necesidad de realizar procedimientos invasivos y transfusiones y la percepción negativa por parte del paciente de su propia salud. Pese a los avances en la monitorización de la hemorragia gastrointestinal en estos pacientes, hemorragias mayores ocurren en hasta un 20% de ellos<sup>2</sup>. En muchos de estos pacientes el sangrado es recurrente y en estos casos el manejo a largo plazo se complica.

Las causas de hemorragia digestiva no relacionada con varices esofágicas en la población general son en primer lugar la úlcera péptica, seguida del síndrome de Mallory-Weiss, la diverticulosis colónica, la hemorragia digestiva de origen desconocido, las angiodisplasias y, por último, las neoplasias. Las angiodisplasias suponen un 4% de las hemorragias digestivas y la causa más importante de anemia inexplicada o hemorragia digestiva de origen oscuro y son la segunda causa de hemorragia digestiva en el anciano<sup>15</sup>.

El diagnóstico etiológico de los pacientes que presentan anemia de probable origen digestivo o bien que han presentado episodios recurrentes de hemorragia digestiva grave es complicado, puesto que las pruebas convencionales (colonoscopia y gastroscopia) en muchas ocasiones son normales. Con el uso de la cápsula endoscópica y la enteroscopia con doble balón muchos de estos pacientes pueden ser diagnosticados. La etiología del sangrado de origen oscuro en general depende de la edad del paciente. En los pacientes más jóvenes predominan los pequeños tumores intestinales, divertículos de Meckel o la enfermedad inflamatoria intestinal. Los pacientes mayores de 40 años tienden a sangrar por lesiones vasculares o angiodisplasias, que suponen más del 40% de todas las causas<sup>16</sup>. Pese a todo, un 20% de estos pacientes se quedan sin diagnóstico.

Las angiodisplasias son malformaciones arteriovenosas presentes en la mucosa y submucosa del tubo digestivo. Se trata de lesiones adquiridas de etiopatogenia poco clara, probablemente resultado de un proceso degenerativo asociado al envejecimiento. Son lesiones generalmente pequeñas, de 2 a 5 mm de diámetro, únicas o múltiples y que consisten en capilares mucosos que drenan a una vena tortuosa en la submucosa. Su incidencia en la población se desconoce, puesto que la mayoría son asintomáticas. Su espectro clínico es muy variable, desde lesiones asintomáticas a otras que se presentan como una hemorragia gastrointestinal aguda o como anemia ferropénica. El tratamiento con AVK aumenta tanto el grado de anemia,

como la frecuencia y la gravedad de los episodios hemorrágicos. En una serie de pacientes con angiodisplasia el 28% de los asintomáticos presentaban algún tipo de coagulopatía<sup>17</sup>.

---

### Manejo clínico

En todos los pacientes, pero especialmente en los pacientes tratados con AVK, una vez las lesiones angioplásticas han empezado a sangrar, son frecuentes las hemorragias recurrentes y la anemia ferropénica persistente, pese al tratamiento con hierro, y la necesidad de transfusiones repetidas. El manejo de estos pacientes es complejo. Se han propuesto diversas soluciones terapéuticas, con poco éxito. El tratamiento local con fotocoagulación con plasma-argón es efectivo en el 80% de los pacientes con angiodisplasias accesibles mediante endoscopia, pero no parece ser una solución definitiva, ya que en muchos pacientes se produce una recurrencia del sangrado<sup>18</sup>. Otra alternativa terapéutica en los pacientes sangrantes por angiodisplasias es la terapia hormonal con etinil-estradiol y noretisterona, aunque en un estudio de cohortes llevado a cabo por Junquera *et al.* no encontró beneficio en la rama tratada con terapia hormonal<sup>17</sup>.

Otra forma de abordar el manejo de estos pacientes es realizar un cambio en la terapia anticoagulante. Dado que los pacientes anticoagulados con AVK presentan un riesgo aumentado de hemorragia digestiva, sobre todo los pacientes con factores de riesgo, como haber presentado episodios hemorrágicos previos, la edad avanzada o la comorbilidad, una solución posible sería la retirada del tratamiento anticoagulante. Pero esta decisión es controvertida y antes es necesario realizar una evaluación del riesgo-beneficio. La mayoría de estos pacientes presentan un riesgo trombotico moderado o alto, por lo que el tratamiento anticoagulante no puede ser interrumpido a largo plazo. Una alternativa al tratamiento con AVK podría ser el uso de heparina de bajo peso molecular (HBPM).

---

### Alternativas a los AVK en pacientes con hemorragia digestiva recurrente

Hay pocos estudios en que se utilice la HBPM como alternativa a los AVK en este tipo de pacientes, aunque sí existen estudios en otros escenarios clínicos en que pacientes tratados con HBPM tienen una menor tasa de complicaciones hemorrágicas mayores y menores que aquellos tratados con AVK. En su estudio Santamaría *et al.* mostraron que pacientes afectados de tromboembolismo venoso tratados con bemiparina (una HBPM de última generación) tenían tasas de sangrado menores a los pacientes tratados con AVK<sup>19</sup>. La causa

de la menor tasa de complicaciones hemorrágicas podría ser que la HBPM presenta un mejor perfil farmacocinético, con un efecto anticoagulante predecible en función de la dosis. Pese a que la seguridad a largo plazo de la HBPM en los pacientes portadores de válvulas protésicas no está demostrada, existen algunos estudios, la mayoría realizados en embarazadas portadoras de prótesis, en los que la HBPM parece ser segura, es decir, presenta una baja incidencia de complicaciones tromboticas<sup>20</sup>.

En los últimos años se han hecho importantes progresos en el desarrollo de nuevos fármacos anticoagulantes con un mejor perfil farmacocinético y con buena biodisponibilidad por vía oral. El desarrollo de pequeñas moléculas activas por vía oral inhibitorias de directas de la trombina o el factor X activado (Xa) y con una respuesta anticoagulante predecible y bajo potencial de interacciones farmacológicas probablemente cambiará el escenario actual del tratamiento anticoagulante oral. El factor Xa parece ser la diana terapéutica más atractiva, ya que está posicionado al inicio de la vía común de la coagulación, y, dado que la cantidad de serinproteasas se amplifica en cada paso de la cascada, la inhibición selectiva de factores por encima de la trombina podría ser una estrategia antitrombótica altamente eficaz. Además, al no inhibir la actividad de la trombina directamente, se permite que trazas de trombina escapen a la neutralización, facilitando la hemostasia y llevando a un perfil de seguridad favorable con respecto a la aparición de hemorragia. De los nuevos anticoagulantes orales actualmente en desarrollo o aprobados para otra indicación, existe un inhibidor directo de la trombina (dabigatrán) y dos inhibidores del factor Xa (rivaroxabán y el apixabán). Dos estudios en fase II han examinado el tratamiento con rivaroxabán en trombosis venosa profunda (TVP) aguda sintomática. El estudio ODIX<sub>3</sub>-DVT aleatorizó 613 pacientes a dos dosis al día de 10, 20 o 30 mg o una dosis de 40 mg frente al tratamiento estándar con enoxaparina y AVK durante 12 semanas. Aunque el objetivo primario (regresión del trombo mediante ultrasonografía) no difirió significativamente entre ambos tratamientos, la tasa de recurrencia sintomática y de sangrado mayor fueron menores en la rama tratada con rivaroxabán<sup>21</sup>.

Estudios en fase III con el rivaroxabán para otras indicaciones, como la fibrilación auricular y el tromboembolismo venoso pulmonar, están todavía en marcha, pero parecen corroborar los resultados de los estudios previos.

---

### Conclusiones

El aumento de pacientes anticoagulados con AVK junto con el aumento de la edad y comorbilidad de los

mismos en los últimos años ha llevado a un aumento de las complicaciones hemorrágicas. La hemorragia digestiva en forma de episodios agudos recurrentes o como anemia ferropénica es una complicación relativamente frecuente en estos pacientes. Además, supone un problema asistencial importante, por la morbimortalidad y el difícil manejo.

La mayoría de las lesiones causantes de esta complicación son las angiodisplasias intestinales. Dado que el tratamiento local como el sistémico de las mismas parece poco eficaz, puesto que reaparecen y se produce en la mayoría de los casos la recidiva hemorrágica; la solución puede estar en un cambio en la terapia anticoagulante. Los AVK tienen una tasa de complicaciones hemorrágicas elevada, sobre todo en pacientes con factores de riesgo, por lo que una solución sería el cambio de terapia por HBPM, con un perfil farmacocinético y un efecto anticoagulante predecible en función de la dosis.

Este escenario puede cambiar con la aparición de los nuevos fármacos anticoagulantes orales, que parecen tener un perfil de seguridad con respecto a las complicaciones hemorrágicas muy favorable. Hasta entonces, la valoración del riesgo-beneficio, la eliminación o control de los factores de riesgo y la valoración de la retirada del tratamiento con AVK y cambio o no por HBPM, son las únicas herramientas para el manejo de estos pacientes.

## Bibliografía

1. Junca, J. Un algoritmo diagnóstico para la ferropenia. *Med Clínica (Barc)* 2001; 116: 146-9.
2. Landefeld CS, Beyth RJ. Anticoagulant-related bleeding: clinical epidemiology, prediction, and prevention. *Am J Med* 1993; 95: 315-28.
3. Johnsen SP, Sorensen HT, Mellemkjoer L, Blot WJ, Nielsen GL, McLaughlin JK, et al. Hospitalisation for upper gastrointestinal bleeding associated with use of oral anticoagulants. *Thromb Haemost* 2001; 86: 563-8.
4. Fihn SD, McDonell M, Martin D, Henikoff J, Vermes D, Kent D, et al. Risk factors for complications of chronic anticoagulation. A multicenter study. Warfarin optimized outpatient follow-up study group. *Ann Intern Med* 1993; 118: 511-20.
5. Petersen P, Boysen G, Godtfredsen J, Andersen ED, Andersen B. Placebo-controlled, randomised trial of warfarin and aspirin for prevention of thromboembolic complications in chronic atrial fibrillation. *Lancet* 1989; 1: 175-9.
6. Stroke prevention in atrial fibrillation Investigators. Stroke Prevention in Atrial Fibrillation study: final results. *Circulation* 1991; 84: 527-39.
7. Hull R, Delmore T, Carter C, Hirsh J, Genton E, Gent M, et al. Warfarin sodium versus low-dose heparin in the long-term treatment of venous thrombosis. *N Engl J Med* 1979; 301: 855-58.
8. Cannegieter SC, Rosendaal FR, Wintzen AR, Van der Meer FJ, Vandembroucke JP, Briët E. Optimal oral anticoagulant therapy in patients with mechanical heart valves. *N Engl J Med* 1995; 333: 11-7.
9. Van der Meer FJ, Rosendaal FR, Vandembroucke JP, Briët E. Bleeding complications in oral anticoagulant therapy. An analysis of risk factors. *Arch Intern Med* 1993 12; 153: 1557-62.

10. Palareti G, Leali N, Coccheri S, Poggi M, Manotti C, D'Angelo A, et al. Bleeding complications of oral anticoagulant treatment: an inception cohort, prospective collaborative study (ISCOAT). Italian study on complications of oral anticoagulation. *Lancet* 1996; 348: 423-8.
11. Torn M, Bollen WL, Van der Meer FJ. Risks of anticoagulant therapy with increasing age. *Arch Intern Med* 2005; 165: 1527-32.
12. Ananthasubramaniam K, Beattie JN, Rosman HS, Hayam V, Borzac S. How safely and for how long can warfarin therapy be withheld in prosthetic heart valve patients hospitalized with a major hemorrhage? *Chest* 2001; 119: 478-84.
13. Wolf AT, Wasan SK, Saltzman JR. Impact of anticoagulation on rebleeding following endoscopic therapy for non-variceal upper gastrointestinal hemorrhage. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 290-6.
14. Navarro JL, César JM, Fernández MA, Fontcuberta J, Reverter JC, Gol-Freixa J. Morbilidad y mortalidad en pacientes con tratamiento anticoagulante oral. *Rev Esp Cardiol* 2007; 60: 1226-32.
15. Garrido A, Márquez JL, Guerrero FJ, Leo E, Pizarro MA, Trigo C. Changes in the etiology, outcome, and characteristics of patients with acute gastrointestinal bleeding between 1999 and 2005. *Rev Esp Enf Dig* 2007; 9: 275-9.
16. Gupta N, Longo WE, Vernava AM. Angiodysplasia of the lower gastrointestinal tract: an entity readily diagnosed by colonoscopy and primarily managed nonoperatively. *Dis Colon Rectum* 1995; 38: 979-82.
17. Junquera F, Feu F, Papo M, Videla S, Armengol JR, Bordas JM, et al. A multicenter, randomized clinical trial of hormonal therapy in the prevention of rebleeding from gastrointestinal angiodysplasia. *Gastroenterology* 2001; 121: 1073-9.
18. Mathus-Vliegen EM. Laser treatment of intestinal vascular abnormalities. *Int J Colorectal Dis* 1989; 4 (1): 20-5.
20. Santamaria A, Juárez S, Reche A, Gómez-Outes A, Martínez-González J, Fontcuberta J. Low molecular weight heparin, bempiparin, in the outpatient treatment and secondary prophylaxis of venous thromboembolism in standard clinical practice: the SFERA Study. *Int J Clin Pract* 2006; 60: 518-25.
21. James AH, Brancaccio LR, Gehrig TR, Wang A, Ortel TL. Low-molecular weight heparin for thromboprophylaxis in pregnant women with mechanical heart valves. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2006; 19: 543-9.
22. Agnelli G, Gallus A, Goldhaber SZ, Haas S, Huisman MV, Hull RD, et al. Treatment of proximal deep-vein thrombosis with the oral direct factor Xa inhibitor rivaroxaban (BAY 59-7939): the ODIXa-DVT (Oral Direct Factor Xa Inhibitor BAY 59-7939 in Patients With Acute Symptomatic Deep-Vein Thrombosis) study. *Circulation* 2007; 116: 180-7.

## HIERRO ORAL O ENDOVENOSO. NUEVOS PREPARADOS

J.A. MUÑOZ<sup>1</sup>, R. JIMÉNEZ<sup>1</sup>, C.E. RISUEÑO<sup>2</sup>, C. DE COS HÖHR<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Hematología del Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz.

<sup>2</sup> IES Fuerte de la Cortadura. Cádiz

La ferropenia es un estado frecuente dentro de la patología humana, afecta al 15-25% de la población y se distinguen una serie de estadios: eritropoyesis ferropé-

nica, ferropenia latente y anemia ferropénica. Estos estadios son progresivos si no se actúa sobre la causa y se realiza un tratamiento sustitutivo<sup>1,2</sup>.

Las principales causas productoras de ferropenia son: a) Aumento de las necesidades de hierro, como ocurre en la infancia, gestación, lactancia, etc. Esta causa debe ser valorada adecuadamente ya que no suelen existir ferropenias exclusivamente relacionadas con ella; b) Pérdida de hierro, fundamentalmente de origen ginecológico (meno-metrorragias) o digestivo pero no debemos olvidar las relacionadas con hemoglobinuria, hematuria, hemoptisis, etc. En este grupo podemos englobar las secundarias a pruebas diagnósticas o las relacionadas con la donación reiterada de sangre; c) Disminución de la absorción del hierro por errores dietéticos, celiaquía, cirugía gastrointestinal, infecciones, etc.

Todas estas causas nos provocarán la deficiencia de hierro, que debe ser diagnosticada por la historia clínica (obtendremos datos relacionados con la anemia en sí, con el tipo y la causa de la anemia), la exploración física y las pruebas biológicas, que comprenden fundamentalmente:

1. Hemograma con reticulocitos y estudio del frotis sanguíneo.
2. Metabolismo del hierro (sideremia, transferrina, ferritinemia y receptor soluble de la transferrina).

Se realizarán las pruebas oportunas para llegar a un diagnóstico biológico y etiológico de la anemia con el fin de proceder al tratamiento, que incluye:

1. Hemoterapia cuando las condiciones hemodinámicas del paciente lo requieran pero sin olvidar obtener las muestras adecuadas para el estudio de anemia previamente a realizar la transfusión; posteriormente se debe valorar la eficacia transfusional.
2. Tratamiento etiológico, si es posible.
3. Tratamiento sustitutivo con hierro oral (de elección) o parenteral.

---

## Hierro oral

Es el tratamiento de elección en las deficiencias de hierro y deben utilizarse sales ferrosas por una mayor eficacia debido a su mejor absorción. La dosificación es de 2-3 mg Fe<sup>++</sup>/kg peso/día durante 60-100 días según se trate de una ferropenia sin anemia o con ella, aunque un control seriado de los pacientes nos pondrá el límite a la suspensión del tratamiento.

Clásicamente el hierro se ha administrado en ayunas, sin embargo, produce frecuentemente intolerancia digestiva que hace que el grado de abandono del tratamiento sea alto. Para evitar este problema nosotros recomendamos la administración de los preparados media hora después de comer o cenar pero evitando los alimentos que inhiban la absorción del hierro

tales como la leche y sus derivados, el café y té por su contenido en taninos, las leguminosas y cereales (fitatos), etc. Por otra parte, se procurará tomar alimentos favorecedores de la absorción del hierro tales como la fruta y sus derivados por su alto contenido en vitamina C así como carnes y/o pescados. Esta pauta trae consigo una adecuada tolerancia y muy pocos abandonos o incumplimientos terapéuticos.

Las sales ferrosas interactúan con: a) Antiácidos e inhibidores de la bomba de protones (omeprazol y similares), provocando una disminución de la absorción del hierro, por lo que la toma de ambos medicamentos debe separarse al menos dos horas; b) Se debe evitar la asociación con metildopa, quinolonas, tetraciclinas y levotiroxina ya que disminuye su absorción, reduciéndose su biodisponibilidad y su efecto clínico.

Los efectos secundarios principales de las sales ferrosas son los derivados de la intolerancia digestiva (náuseas, vómitos, epigastralgia, diarrea, estreñimiento) y menos frecuentes la erupción cutánea y el sabor metálico. No debemos olvidar advertir a los pacientes de dichos efectos secundarios y su manejo así como del color negro de las heces. La sobredosificación aguda que puede dar lugar a cuadros graves inmediatos y tardíos (fallo hepático) es una rara complicación del tratamiento.

El tratamiento sustitutivo debe completarse hasta un mínimo de 60-100 días aunque depende de la actuación sobre la causa productora de la ferropenia y de los valores biológicos obtenidos, ya que el objetivo inicial es la elevación de los niveles de hemoglobina con el fin de evitar o minimizar la hipoxia. Este primer objetivo se puede conseguir entre los 15 y 20 días de iniciado el tratamiento. El objetivo final es la normalización de los niveles de hemoglobina y la reposición de los depósitos de hierro (ferritinemia); esto depende no sólo de la adecuada duración del tratamiento sino también de la solución del problema causante de la ferropenia.

Los parámetros biológicos a evaluar son el hemograma con reticulocitos<sup>3</sup> y el estudio del metabolismo del hierro. Nuestros resultados en un grupo de 87 pacientes con anemia ferropénica se muestran en la Tabla 1, donde se expresan los valores biológicos más relevantes a los 16 y 98 días de tratamiento.

Uno de los problemas más importantes en el manejo de la ferropenia es la falta de respuesta, pudiendo obedecer a intolerancia digestiva con incumplimiento del tratamiento; diagnóstico erróneo (mala utilización del hierro en lugar de deficiencia); persistencia de la causa de la anemia; malabsorción del hierro; trastorno de conducta (pica, síndrome de Lathénie de Ferjol), etc. La actuación en estos casos se debe limitar a conocer la causa y actuar sobre ella, y en los casos de intolerancia digestiva proceder a cambiar el preparado comercial pero manteniendo siempre sales ferrosas y si persiste la intolerancia grave iniciar tratamiento parenteral.

Los preparados de hierro más comúnmente utilizados en el tratamiento de la anemia ferropénica se recogen en la Tabla 2.

### Hierro parenteral

Es el tratamiento de segunda línea en el manejo de las deficiencias de hierro y sus indicaciones<sup>4</sup> están limitadas a la intolerancia oral grave, la falta de respuesta a la terapia convencional (gastritis atrófica autoinmune, gastritis en relación a *H. pylori*, etc.) o malabsorción del hierro. También se utiliza en la anemia renal con componente ferropénico tanto en fase de diálisis como en prediálisis<sup>5,6</sup>, en el tratamiento con eritropoyetina, la donación autóloga perioperatoria, la anemia preoperatoria<sup>7</sup>, la anemia asociada a la enfermedad inflamatoria intestinal y las anemias ferropénicas graves gestacionales y postparto<sup>8</sup>, pero no debe utilizarse en el primer trimestre de la gestación, ya que no es segura la ausencia de manifestaciones teratógenas y debe usarse con precaución en la insuficiencia hepática, infección aguda o crónica, pacientes con historia de asma, eczema o alergias.

Los preparados disponibles han ido cambiando a lo largo de los años y en España hemos pasado de utilizar hierro dextrano de alto peso y gluconato a hierro sacarosa, hierro dextrano de bajo peso molecular (presenta hasta un 5% de manifestaciones adversas dependientes, generalmente, de la dosis y en un porcentaje no despreciable de casos hay un riesgo de reacción anafiláctica aguda y grave que limita su uso). En la actualidad, estamos comenzando a utilizar el hierro carboximaltosa que es una de las novedades de la terapia con hierro parenteral junto al ferumoxytol, debido a su facilidad de uso, así como a su seguridad y eficacia.

El **ferumoxytol**<sup>9</sup> es un coloide con partículas de 30 nm y pm de 750 Kd. Cada mL contiene 30 mg de Fe elemental y 40 mg de manitol. La dosificación no está totalmente establecida ya que aún no está disponible para su uso generalizado aunque los resultados son muy esperanzadores<sup>10,11</sup>.

El **hierro-sacarosa** es un complejo de hidróxido de hierro con sacarosa que tiene un peso molecular aproximado de 43 Kda y en el plasma se une a la transferrina para su transporte al eritroblasto. Tiene una escasa eliminación renal y las reacciones adversas son poco frecuentes y excepcionales las anafilácticas. No se han descrito casos letales con el uso de estos preparados de hierro. El cálculo de dosis se realiza con la fórmula:

$$[\text{Peso corporal (kg)} \times \Delta \text{Hb (g/dL)} \times 2,4] + 500$$

Factor 2,4: cada g de Hb contiene 3,4 mg de hierro y el volumen de sangre es 70mL/kg peso. Hierro de depósito: 500, si el peso es > 35 kg; 15 mg/kg peso, si el peso < 35 kg. El incremento de Hb debe ser establecido individualmente.

Tabla 1. Valores biológicos en el tratamiento con sales ferrosas v.o. de las 87 anemias ferropénicas seguidas en el servicio de hematología durante el año 2008

	Basal	16 días	98 días
Hb (g/dL)	8,9 ± 1,6	10,7 ± 1,4	12,7 ± 1,4
VCM (fL)	72,3 ± 8,0	77,8 ± 7,1	84,4 ± 5,4
RDWSD (fL)	47,2 ± 7,2	60,0 ± 10,4	50,6 ± 8,1
Retx10 <sup>3</sup> /μL	52,1 ± 22,9	91,6 ± 41,2	46,8 ± 20,0
LFR %	83,2 ± 8,5	79,9 ± 9,8	89,9 ± 5,5
RetHe (pg)	19,8 ± 4,6	26,5 ± 4,8	28,2 ± 3,3
Fe (μg/dL)	23,8 ± 15,3		53,7 ± 32,4
TIBC (μg/dL)	439,3 ± 79,7		387 ± 85
Ferritina (ng/mL)	5,1 ± 4,9		13,6 ± 6,4
RTrf (mg/L)	7,6 ± 2,5		4,2 ± 2,6

Tabla 2. Preparados de hierro vía oral más comúnmente utilizados para la deficiencia férrica

Compuesto	Presentación
Ferroglicina sulfato	· Cápsulas de 100 mg Fe <sup>++</sup> · Solución de 30 mg Fe <sup>++</sup> /mL
Gluconato ferroso	· Comprimidos efervescentes de 25 y 80 mg Fe <sup>++</sup>
Lactato ferroso	· Viales de 37,5 mg Fe <sup>++</sup>
Sulfato ferroso	· Gotas de 25 mg Fe <sup>++</sup> /mL · Cápsulas de 106 mg Fe <sup>++</sup> · Grageas de 80 mg Fe <sup>++</sup>

y la dosis total se administra en fracciones de 100 mg/d x 3 dosis a la semana y en casos excepcionales a dosis de 200 mg/d x 3 dosis a la semana.

La droga es eficaz y segura incluso en niños<sup>12</sup> y los efectos secundarios son escasos, incluyendo irritación local y flebitis, sabor metálico, hipotensión, mareo, cefalea, coloración de la piel si se produce extravasación y que puede llegar a desarrollar necrosis debido a que es una solución muy alcalina e irritante. En nuestra serie de 24 ciclos de tratamiento correspondientes a 18 casos tratados con hierro sacarosa hemos encontrado que el sabor metálico es el efecto indeseable más frecuente, afectando al 21% de los casos, le siguen los casos de hipotensión y mareos de carácter leve y sólo hemos tenido un caso de extravasación del medicamento con dolor intenso, flebitis y necrosis en la zona.

El preparado no debe utilizarse en los casos de anemia no atribuibles a un déficit de hierro o en las anemias de trastorno crónico sin ferropenia asociada y para ello es necesario que antes de iniciar este tipo de tratamiento se diagnostique correctamente la deficiencia de hierro mediante la historia clínica, exploración física y pruebas biológicas, que deben incluir la sideremia, transferrina, ferritina y receptor sólo-

**Tabla 3. Valores biológicos en el tratamiento con hierro sacarosa de 24 anemias ferropénicas pertenecientes a 18 pacientes seguidas en el servicio de hematología durante 2008**

	Basal	9 días	30 días
Hb (g/dL)	8,6 ± 2,0	10,7 ± 1,0	12,4 ± 1,0
VCM (fL)	73,6 ± 6,2	81,7 ± 4,9	83,3 ± 5,3
RDWSD (fL)	46,9 ± 4,3	67,5 ± 7,6	58,4 ± 10,5
Retx10 <sup>3</sup> /μL	47,3 ± 15,9	64,6 ± 23,0	48,5 ± 22,7
LFR (%)	88,7 ± 5,3	89,8 ± 5,7	91,7 ± 4,0
RetHe (pg)	21,8 ± 5,3	30,7 ± 3,9	29,7 ± 3,3
Fe (μg/dL)	20,3 ± 10,1		43,5 ± 10,2
TIBC (μg/dL)	465,3 ± 45,9		275 ± 36
Ferritina (ng/mL)	4,8 ± 4,0		64,6 ± 20,7
RTrf (mg/L)	6,7 ± 2,1		3,5 ± 1,3

ble de la transferrina así como haptoglobina, proteína C reactiva, citocinas proinflamatorias, etc., todo ello con el fin de evitar los efectos indeseables de la terapia férrica<sup>13</sup>.

En nuestra serie de 24 tratamientos (Tabla 3) hemos observado una adecuada eficacia con escasos efectos secundarios, salvo la extravasación de la medicación. El primer objetivo del tratamiento se obtuvo a los 9 días y a los 30 días el nivel de hemoglobina era similar al observado con las sales ferrosas a los 98 días del tratamiento oral.

El **hierro-carboximaltosa** es un complejo macromolecular polinuclear de hierro(III) con una cubierta de carbohidratos (carboximaltosa)<sup>14</sup>. Esta conformación especial le permite el acceso directo a los macrófagos, uniéndose a la apoferritina para formar ferritina, que va liberando hierro conforme a las necesidades del organismo.

Su peso molecular es de 150,000 d. Contiene unos 1.000 átomos de hierro (27%); es soluble en agua y muy estable, no generando hierro lábil.

Las indicaciones son similares a las enunciadas anteriormente y la posología se tiene que calcular mediante la fórmula indicada con el hierro sacarosa.

Presenta la ventaja de admitir una dosis única máxima en infusión intravenosa de 1.000 mg, que puede administrarse una vez por semana. Además se trata de un preparado con baja inmunogenicidad por lo que no requiere comenzar con dosis pequeñas de prueba.

Varios estudios clínicos han comparado carboximaltosa de hierro con sulfato ferroso (se expone un resumen en la Tabla 4) con un adecuado perfil de seguridad y de eficacia manifestada por la rapidez en la subida de los niveles de hemoglobina y en la restitución de los depósitos de hierro; buena tolerancia y baja incidencia de efectos secundarios gastrointestinales.

Por todo ello, el hierro carboximaltosa constituye una buena opción de tratamiento en pacientes en los que los preparados orales se han mostrado ineficaces, que son intolerantes a los mismos o en aquellos que, por sus circunstancias sociales o su comorbilidad requieren reducir el número de administraciones intravenosas o de estancias hospitalarias<sup>19</sup>.

En resumen, el diagnóstico clínico-biológico así como el etiológico son fundamentales para el tratamiento de la deficiencia de hierro, que debe ser sustitutivo y etiológico, debiéndose demostrar la eficacia del mismo. Las sales ferrosas por vía oral son el tratamiento de elección en la deficiencia férrica por su efectividad, seguridad y comodidad.

La vía parenteral debe quedar reservada para casos de intolerancia grave, falta de respuesta a la terapia oral o situaciones especiales. Los preparados actuales (hierro sacarosa y hierro carboximaltosa) son seguros y eficaces en la corrección de la deficiencia de hierro.

**Tabla 4. Estudios clínicos sobre la eficacia de la carboximaltosa férrica (CMF) frente al sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>) en diferentes patologías**

Características	Dosis CMF	Dosis FeSO <sub>4</sub>	Objetivo principal	Resultados	
				FeSO <sub>4</sub>	CMF
Anemia ferropénica en el posparto. (344 pacientes) <sup>15</sup>	Máximo 1.000 mg/sem 3 sem máximo	200 mg/día 12 semanas	Δ Hb (g/L)	32,9 g/L	33,7 g/L Resultados similares
Anemia ferropénica en el posparto. (361 pacientes) <sup>16</sup>	Máximo 1.000 mg/sem Dosis máxima 2.500 mg	975 mg/día 6 semanas	Δ Hb ≥ 2 g/dL (% pacientes)	94%	96% Resultados similares
Anemia ferropénica en el posparto. (291pacientes) <sup>17</sup>	Máximo 1.000 mg/sem Dosis máxima 2.500 mg	975 mg/día 6 semanas	Hb ≥12 g/dL (% pacientes)	67%	91% Significación estadística
Anemia ferropénica secundaria a enfermedad inflamatoria intestinal (196 pacientes) <sup>18</sup>	Máximo 1.000 mg/sem 3 semanas máximo	200 mg/día 12 semanas	Δ Hb (g/L)	37,5 g/L	38,3 g/L Resultados similares

Tanto la carboximaltosa férrica como el ferumoxytol aportan la posibilidad de ser administrados de una sola dosis, lo que supone una disminución de la estancia en los hospitales de día y una ventaja para determinados pacientes en situación especial (ancianos, comorbilidad acusada, etc.).

## Bibliografía

- Muñoz I, Reinoso FL, López A, Hernández F. Trastornos del metabolismo del hierro. *Medicine* 2008; 10: 1318-25.
- Clark SF. Iron deficiency anemia: diagnosis and management. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; 25: 122-28.
- Kim JM, Ihm CH, Kim HJ. Evaluation of reticulocyte haemoglobin content as marker of iron deficiency and predictor of response to intravenous iron in haemodialysis patients. *Int Jnl Lab Hem* 2008; 30: 46-52.
- Auerbach M, Coyne D, Ballard H. Intravenous iron: From anathema to standard of care. *Am J Hematol* 2008; 83: 580-8.
- Rosen Zvi B, Gafter-Gvili A, Paul M, et al. Intravenous versus oral iron supplementation for the treatment of anemia in CKD: Systematic review and meta-analysis. *A J Kidney* 2008; 52: 897-906.
- Fishbane S. Anemia in chronic kidney disease: status of new therapies. *Curr Opin Nephrol Hyperens* 2009; 18: 112-5.
- Muñoz M, García-Erce JA, Villar I, Thomas D. Blood conservation strategies in major orthopaedic surgery: efficacy, safety and European regulations. *Vox sanguinis* 2009; 96: 1-13.
- Milman N. Prepartum anaemia: prevention and treatment. *Ann Hematol* 2008; 87: 949-59.
- Balakrishnan VS, Rao M, Kausz AT, et al. Physicochemical properties of ferumoxytol, a new intravenous iron preparation. *Eur J Clin Invest* 2009; 39: 489-96.
- Singh A, Hertel J, Patel T, et al. Safety of ferumoxytol in patients with anemia and CKD. *Am J Kidney Dis* 2008; 52: 907-15.
- Spinowitz BS, Kausz AT, Batista J, et al. Ferumoxytol for treating iron deficiency anemia in CKD. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 1599-605.
- Pinsk V, Levy J, Moser A, et al. Efficacy and safety of intravenous iron sucrose therapy in a group of children with iron deficiency anemia. *Isr Med Assoc J* 2008; 10: 335-8.
- Katodritou E, Verrou E, Zervas K. Intravenous iron: A useful therapeutic tool but not a panacea. *Am J Hematol* 2008; 83: 521-3.
- Lyseng-Williamson KA, Keating GM. Ferric carboxymaltose: a review of its use in iron-deficiency anaemia. *Drugs* 2009; 69: 739-56.
- Breymann C, Gliga F, Bejenariu C, Strizhova N. Comparative efficacy and safety of intravenous ferric carboxymaltose in the treatment of postpartum iron deficiency anemia. *Int J gynaecol Obstet* 2008; 10: 67-73.
- Van Wyck DB, Martens MG, Seid MH, Baker JB, Mangione A. Intravenous ferric carboxymaltose compared with oral iron in the treatment of postpartum anemia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2007; 110: 267-78.
- Seid MH, Derman RJ, Baker JB, Banach W, Goldberg C, Rogers R. Ferric carboxymaltose injection in the treatment of postpartum iron deficiency anemia: a randomized controlled clinical trial. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199: 435.e1-7.
- Kulnigg S, Stoinov S, Simanenkova V, Dudar LV, Karnafel W, Garcia LC, et al. A novel intravenous iron formulation for treatment of anemia in inflammatory bowel disease: the ferric carboxymaltose (FERINJECT) randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1182-92.

- Peebles G, Fenwick S. Intravenous iron administration in a short-stay hospital setting. *Nurs Stand* 2008; 22: 35-41

## HELICOBACTER PYLORI Y ANEMIA FERROPÉNICA

C. BENAVENTE, F.A. GONZÁLEZ  
*Servicio de Hematología y Hemoterapia.  
 Hospital Clínico San Carlos. Madrid*

La gastritis por *Helicobacter pylori* (Hp) ha sido asociada en los últimos años a diferentes enfermedades no gástricas. Su posible implicación en la patogénesis de estas enfermedades, se fundamenta en que la inflamación local gástrica puede causar efectos sistémicos e inducir una respuesta inmune capaz de producir lesiones en otros territorios. Y que además, la erradicación de la bacteria mejora estas patologías<sup>1</sup>.

La infección gástrica por Hp ha surgido como una nueva causa de anemia ferropénica en pacientes que no responden al tratamiento con hierro. La relación entre Hp y metabolismo del hierro se basa en datos clínicos, ferrocinéticos y microbiológicos. Sin embargo, los mecanismos biológicos por los cuales induce una alteración en los depósitos del hierro no son bien conocidos, aunque parecen implicadas varias vías como pequeñas hemorragias gástricas, descenso en la absorción de hierro y aumento de la captación de hierro por parte de la bacteria.

## Datos clínicos

El primer caso de anemia ferropénica asociada a infección por Hp fue publicado en 1991. Se trataba de una adolescente de 15 años de edad que ingresó en el hospital después de una semana de astenia y fatiga progresiva, sin síntomas gástricos asociados. Las pruebas diagnósticas revelaron una gastritis crónica activa asociada a Hp. La paciente fue tratada para la infección de Hp sin suplementos de hierro. Junto con la erradicación del Hp, desaparecieron las lesiones hemorrágicas gástricas y se normalizaron los niveles de hemoglobina<sup>2</sup>.

El segundo caso fue publicado en 1993, se trataba de un niño de siete años de edad con una larga historia de anemia ferropénica refractaria al tratamiento con hierro, de etiología no filiada (en el estudio realizado no se había demostrado sangrado gastrointestinal ni problemas en la absorción de hierro). El único hallazgo patológico fue una antritis micronodular, debida a una gastritis crónica superficial no activa Hp positiva sin síntomas gástricos. La hipótesis de la

implicación del Hp en el metabolismo del hierro fue sugerida porque la anemia no se corrigió hasta que se erradicó la infección por Hp<sup>3</sup>.

Mientras que en el primer caso la anemia podía ser atribuida a las pérdidas gatrointestinales por sangrado, la mayoría de casos publicados posteriormente son pacientes sin evidencia de sangrado gastrointestinal con una respuesta al tratamiento con hierro vía oral subóptima, en los que se había descartado déficit de aporte nutricional, sangrado digestivo, infección por parásitos y otras causas comunes de anemia ferropénica. En la mayoría de los pacientes la anemia se corrigió después de erradicar la infección por Hp. Inicialmente los casos publicados eran de niños y adolescentes pero posteriormente también se han publicado casos en adultos (Tabla 1).

En los últimos años han sido realizados varios estudios epidemiológicos en los que se asocia la infección por Hp a estados de ferropenia y anemia ferropénica.

Uno de los primeros estudios fue llevado a cabo en 102 sujetos asintomáticos con edades comprendidas entre 66 y 101 años. Este estudio mostró niveles de Hb, ferritina, sideremia y transferrina sérica similares entre sujetos infectados y no infectados por Hp. Pero dado que la prevalencia de infección por Hp era muy alta en esa población (82-86%) es posible que la muestra no tuviese un tamaño adecuado para poder demostrar diferencias significativas<sup>4</sup>.

En Dinamarca se realizó un estudio con 2.794 sujetos. En hombres y en mujeres postmenopáusicas se apreció un nivel de ferritina significativamente más bajo en sujetos seropositivos frente a seronegativos. El riesgo de ferropenia (ferritina < 15 µg/L) sólo se observó en mujeres posmenopáusicas seropositivas (6,5 vs. 2,3% en

seronegativas). No se vieron diferencias entre los niveles de Hb ni de anemia ferropénica en relación con la seropositividad<sup>5</sup>. En un estudio realizado en Australia se encontró asociación entre niveles bajos de ferritina en mujeres infectadas por Hp, respecto a no infectadas. Esta asociación no se evidenció en varones. Sin embargo, en un estudio realizado en Nueva Zelanda esta relación apareció en varones y no en mujeres<sup>6</sup>. También en otro estudio de Alemania con 1.806 sujetos mayores de 18 años se observó relación del estado de ferropenia con pacientes infectados por Hp frente a no infectados<sup>7</sup>. Asimismo, en un estudio realizado en Alaska en 2.080 sujetos, se asoció un mayor riesgo de ferropenia (ferritina < 12 µg/L) en sujetos infectados por Hp frente a no infectados (13%)<sup>8</sup>. Un estudio epidemiológico realizado en Estados Unidos en 7.462 sujetos evidencia un riesgo de anemia ferropénica de 2,6 veces más en sujetos seropositivos respecto a seronegativos<sup>9</sup>.

Weyermann *et al.* estudiaron el impacto de la infección por Hp en la anemia durante el embarazo. Estudiaron 898 mujeres mediante test del aliento cinco días después del parto. Se revisaron los niveles de Hb durante el embarazo. La prevalencia de anemia fue del 28,1% en mujeres infectadas por Hp frente al 17,5% en las no infectadas. La Hb inicial fue más baja en mujeres infectadas que en las no infectadas, así como una peor respuesta al tratamiento durante el embarazo. El efecto de la infección por Hp en la Hb de las mujeres embarazadas apoyó el papel de la infección por Hp en el desarrollo de anemia en condiciones en las que se necesitan altos requerimientos de hierro como es el embarazo<sup>10</sup>.

Existen estudios epidemiológicos sólo en población pediátrica. En un estudio realizado en Corea del Sur se

Tabla 1. *Helicobacter pylori* y anemia ferropénica (AF): casos publicados

Autor	Año	País	Tipo de estudio	Población	Casos (n)	Resultados
Blecker	1991	Bélgica	Caso	Adolescente	1	Resolución de la AF después de erradicar Hp asociada a gastritis
Dufour	1993	Italia	Caso	Pediátrica	1	Resolución de la AF después de erradicar Hp asociada a gastritis
Bruel	1993	Francia	Caso	Pediátrica	1	Resolución de la AF después de erradicar Hp asociada a gastritis
Marignani	1997	Italia	Caso	Adolescente	1	Resolución de la AF después de erradicar Hp asociada a gastritis
Carnicer	1997	España	Caso	Pediátrica	1	Resolución de la AF después de erradicar HP asociada a gastritis
Babarino	1999	Italia	Serie de casos	Pediátrica	4	Resolución de la AF después de erradicar HP asociada a gastritis
Choe	1999	Corea	Aleatorizado	Adolescente	43	AF+HP, mejoría de la Hb después de tratamiento erradicador HP frente a placebo
Konno	2000	Japón	Serie de casos	Adolescente	6	Resolución de la AF después de erradicar HP asociada a gastritis
Ashorn	2001	Finlandia	Serie de casos	Pediátrica	7	Resolución de la AF después de erradicar HP asociada a gastritis
Sugiyama	2002	Japón	Serie de casos	Mujeres	2	Resolución de la AF después de erradicar HP asociada a gastritis
Kostaki	2003	Grecia	Serie de casos	Pediátrica	3	Resolución de la AF después de erradicar HP asociada a gastritis
Yoshimura	2003	Japón	Serie de casos	Adultos	2	Resolución de la AF después de erradicar HP asociada a gastritis
Hacihanefioglu	2004	Turquía	Serie de casos	Mujeres	14	Incremento de la Hb, sideremia e IST. Sin cambios en la ferritina

demonstró una prevalencia de infección por Hp de 31% en niños con anemia ferropénica frente al 15,5% en niños sin ella<sup>11</sup>. Se demostró que esta asociación era mayor en niños atletas, por lo que se pensó que podía estar en relación con unos mayores requerimientos de hierro. También se encontró asociación entre la infección por Hp y estado de ferropenia<sup>12</sup>. Sin embargo, en otro estudio realizado también en Corea del Sur, en niños en edad escolar entre 9 y 12 años, no se encontró esta asociación<sup>13</sup>. Una posible explicación es la corta edad de los niños con poco tiempo de exposición a la infección por Hp, y no tener requerimientos nutricionales excesivos.

Tienen especial interés los estudios clínicos con intervención terapéutica. El primer estudio fue realizado por Choe *et al.* en Corea del Sur<sup>14</sup>. Se trata de un estudio doble ciego, en 43 chicas adolescentes y preadolescentes con anemia ferropénica, sin evidencia de sangrado gastrointestinal. En 25 pacientes se evidenció infección por Hp por gastroscopia y fueron aleatorizadas en tres grupos de tratamiento: a) tratamiento erradicador de Hp más hierro oral, b) tratamiento erradicador de Hp más placebo oral y c) hierro oral más placebo de tratamiento erradicador de Hp. Se evaluó la respuesta a las ocho semanas de finalizado el tratamiento y, se vio un aumento significativo de Hb en los grupos en los que se había erradicado el Hp (*a* y *b*, con una mayor respuesta en el grupo *a*). En el grupo *c* no se encontró un aumento significativo de los niveles de Hb, a pesar del tratamiento con hierro oral. Este estudio muestra una clara relación entre la anemia ferropénica y la infección por Hp. El tratamiento de la infección se asocia con una respuesta más rápida que con hierro solo. La erradicación de la infección por Hp conduce a una mejora en el metabolismo del hierro incluso cuando no se recibe hierro por vía oral.

Recientemente se ha llevado a cabo un estudio en Bangladesh, donde la prevalencia en la población pediátrica de anemia ferropénica es muy alta (> 50%), así como la infección por HP (60% en menores de 5 años)<sup>15</sup>. Se diseñó el estudio para demostrar la relación causal entre la infección por HP y anemia ferropénica, y también si dicha infección era un factor responsable en la falta de respuesta a los suplementos de hierro en niños de países menos desarrollados. Se trata de un estudio aleatorizado de 1.498 niños entre 2 y 5 años en los que no existían carencias nutricionales. De ellos se aleatorizaron 200 niños con anemia ferropénica e infección por HP en cuatro grupos: 1) tratamiento erradicador de HP y suplemento de hierro, 2) tratamiento erradicador de HP, 3) suplemento de hierro y 4) placebo. Los niños que recibieron suplementos de hierro tuvieron menos fracasos terapéuticos que aquellos que no lo recibieron (11% en los anti-HP y hierro, 0% en los de hierro solo, 33% en los de sólo anti-HP y 45% en los de placebo). También se evaluó en los subgru-

pos si había diferencias de la Hb y de los estudios de hierro entre los pacientes en que se había conseguido erradicar la infección por HP frente a los que persistía la infección, y no se apreciaron diferencias significativas. A la luz de estos hallazgos, los autores concluyeron que la infección por HP no es una causa de refractariedad al tratamiento en estos niños y que no interviene en la absorción del hierro. En áreas con alta prevalencia de HP y ferropenia, ni la prevención, ni el diagnóstico, ni el tratamiento de HP en edades muy tempranas, parece ser una estrategia eficaz para reducir la ferropenia ni la anemia ferropénica.

---

## Mecanismos biológicos

Varios estudios han sugerido diferentes mecanismos biológicos por los cuales la infección por HP induce la depleción de los depósitos de hierro en el huésped.

### Cambios en la fisiología e histología gástrica

Pacientes con infección por HP cuya forma de presentación es anemia ferropénica presentan algunas características histopatológicas y cambios en la fisiología gástrica, tales como una reducción del ácido ascórbico y la elevación del pH gástrico, que pueden reducir la absorción intestinal de hierro de la dieta. Por tanto, se piensa que estos hallazgos pueden estar implicados en el desarrollo de la ferropenia.

Se sabe que el pH ácido del jugo gástrico desempeña un papel importante en la reducción del hierro de forma férrica a ferrosa, que es la forma química soluble capaz de atravesar la membrana de la mucosa intestinal. Esta reacción es favorecida por el ácido ascórbico, el cual es considerado como el potenciador más importante en la absorción de hierro desde el estómago. El pH ácido y el ácido ascórbico son necesarios para la absorción de hierro de la dieta.

Zhang *et al.* evaluaron el impacto de la infección por HP en el ácido ascórbico gástrico. Llevaron a cabo un estudio en 115 pacientes en los que se había realizado una gastroscopia por dispepsia<sup>16</sup>. Las concentraciones de jugo gástrico y ácido ascórbico fueron significativamente más bajas en los pacientes infectados por HP que en aquellos que no lo estaban. Se observó una mayor reducción cuando la inflamación gástrica progresaba desde normal a gastritis antral difusa y a pangastritis. La influencia negativa del HP en el ácido ascórbico gástrico era reversible después de un tratamiento erradicador y de curada la infección.

Ciacci *et al.* midieron directamente el impacto de la infección por HP en la absorción del hierro<sup>17</sup>. En el estudio participaron 55 enfermos a los que se les había realizado gastroscopia por sospecha de infección por

HP. La absorción del hierro fue calculada como la diferencia en el hierro sérico de muestras de sangre obtenidas de los pacientes justo antes de la administración de 1 mg/kg de hierro ferroso y dos horas después. Los pacientes infectados por HP tuvieron una absorción significativamente menor que aquellos no infectados. Después de estratificar por sexos esta diferencia sólo fue significativa en las mujeres. La absorción de hierro mejoró después de corregida la infección.

### **Aumento del consumo de hierro por el HP**

La depleción de los depósitos de hierro puede ocurrir en presencia de la infección por HP como resultado del incremento de las necesidades de la bacteria para su crecimiento. Se sabe que todas las bacterias necesitan hierro para su crecimiento e incluso compiten con el huésped por sus depósitos de hierro.

Babarino *et al.* llevaron a cabo un estudio de ferrocinética en cuatro niños con anemia ferropénica en la que el único hallazgo era la gastritis por HP<sup>18</sup>. Los resultados obtenidos no fueron los típicos de una anemia ferropénica. En las anemias ferropénicas por aporte insuficiente de hierro, sangrado gastrointestinal o mala absorción, el hierro marcado tiene una vida media plasmática muy corta porque es utilizado por la médula ósea, y a los diez días, más del 90% de los hematíes circulantes tienen hierro marcado. En el caso de los pacientes con anemia ferropénica asociada a HP, el hierro marcado tenía una vida media muy corta pero a los diez días los hematíes circulantes marcados eran pocos, lo cual hacía pensar que el hierro podía ser utilizado por un foco extramedular (el antro infectado por HP). Esta hipótesis no pudo ser confirmada en el estudio por problemas técnicos de medicina nuclear.

El efecto antagónico de la respuesta de los suplementos de hierro fue analizado en un estudio aleatorizado en la India en 169 niños. La infección asintomática por HP no se asociaba con una mayor ferropenia o anemia ferropénica, pero sí con una menor respuesta al tratamiento con suplementos de hierro<sup>19</sup>.

La regulación del consumo de hierro es en parte diferente al de otras bacterias. Algunos sistemas de consumo de hierro en el HP son expresados, probablemente para la adaptación de la bacteria al medio del estómago que puede presentar carencia o sobrecarga de hierro.

Las bajas concentraciones de hierro libre en la mucosa y en los tejidos es una de las primeras medidas de defensa del huésped en la infección bacteriana. Este fenómeno es conocido como hiposideremia de la infección. Se piensa que hay dos mecanismos implicados: uno, el aumento de producción de ferritina por el hígado y, otro, la liberación de lactoferrina de los neutrófilos. En estados de déficit de hierro, la lactoferrina

captura el hierro de la transferrina. El complejo hierro-lactoferrina es fijado por los macrófagos circulantes e incorporado al sistema reticuloendotelial.

En 1993, Husson demostró *in vitro* que la lactoferrina humana era un soporte de crecimiento del HP en ausencia de otras fuentes de hierro<sup>20</sup>. Esta propiedad de usar la lactoferrina humana como aporte de hierro puede representar un papel en la virulencia del HP. En 1997 Dhaenens identificó una proteína de unión de la lactoferrina en la membrana del HP que sólo se expresaba cuando la bacteria crecía en medios carentes de hierro, lo cual podía ser un mecanismo para evitar la hiposideremia defensiva del huésped<sup>21</sup>.

Estudios posteriores demostraron *in vivo* niveles altos de lactoferrina en el tejido y jugo gástrico de pacientes con gastritis por HP y estos niveles se correlacionan con el grado inflamatorio de la mucosa. Además, la erradicación del HP se asociaba con descenso de los niveles de lactoferrina<sup>22</sup>.

Estudios recientes demuestran que la propiedad de desarrollar mecanismos de absorción de hierro por HP en estados de carencia no es igual en todas las cepas de la bacteria, y que podrían tener gran importancia en la virulencia de la misma. Así, se ha demostrado que cepas de HP que se asocian con anemia ferropénica tienen una mayor expresión de proteínas con capacidad para absorber hierro (IROMPs)<sup>23</sup>.

### **Pequeñas hemorragias ocultas gastrointestinales**

Una de las posibles explicaciones de la relación entre la infección por HP y la reducción de los depósitos de hierro son pequeñas pérdidas gastrointestinales inducidas por la infección. Desde mínimos sangrados por pequeñas erosiones de la mucosa gástrica hasta sangrado masivo por úlcera péptica o carcinoma gástrico. La mayoría de los casos y series publicadas no han detectado lesiones de sangrado en las gastroscopias y/o test de hemorragias ocultas en heces. Esto va en contra de este mecanismo en la patogénesis de la anemia ferropénica, pero hay otros estudios en los cuales sí se puede considerar.

### **Conclusiones**

En el momento actual existen datos clínicos que relacionan la infección por HP con anemia ferropénica. En la mayoría de estos pacientes, el único hallazgo es la gastritis por HP. La respuesta de la anemia al tratamiento con hierro oral no es adecuada y ésta sólo se consigue después de la erradicación de la bacteria, algunas veces incluso sin suplementos de hierro. Por lo que en la práctica clínica hay que tener en cuenta esta etiología en pacientes con anemia ferro-

pénica no filiada y/o una respuesta subóptima al tratamiento.

Los mecanismos fisiopatológicos por los cuales la infección por HP puede contribuir a la anemia ferropénica son aún desconocidos. Sin embargo, existen posibles explicaciones: la hemorragia oculta producida por gastritis crónica erosiva, la disminución de la absorción de hierro por hipo o aclorhidria y el aumento del consumo de hierro por la propia bacteria. Parece que existen mecanismos complejos en la regulación y absorción del hierro en los que están implicados la interacción de la propia bacteria y el huésped.

Son necesarios más estudios para confirmar si existe una relación causal de la infección por HP con anemia ferropénica y déficit de hierro. Así como para estudiar sus mecanismos fisiopatológicos.

## Bibliografía

1. A Barabino. Helicobacter pylori-related iron deficiency anemia: a review. *Helicobacter* 2002; 7: 71-5.
2. Blecker U, Renders F, Lanciers S, Vandenplas Y. Syncope leading to the diagnosis of a Helicobacter pylori positive chronic active haemorrhagic gastritis. *Eur J Pediatr* 1991; 150: 560-1.
3. Dufour C, Brisigotti M, Fabretti G, Luxardo P, Mori PG, Barabino A. Helicobacter pylori gastric infection and sideropenic refractory anemia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 17: 225-7.
4. Pilotto A, Fabrello R, Franceschi M, et al. Helicobacter pylori infection in asymptomatic elderly subjects living at home or in a nursing home: effects on gastric function and nutritional status. *Age Ageing* 1996; 25: 245-9.
5. Milman N, Rosenstock S, Andersen L, Jorgensen T, Bonnevie O. Serum ferritin, hemoglobin, and Helicobacter pylori infection: a seroepidemiologic survey comprising 2794 Danish adults. *Gastroenterology* 1998; 115: 268-74.
6. Collett JA, Burt MJ, Frampton CM, et al. Seroprevalence of Helicobacter pylori in the adult population of Christchurch: risk factors and relationship to dyspeptic symptoms and iron studies. *N Z Med J* 1999; 112: 292-5.
7. Berg G, Bode G, Blettner M, Boeing H, Brenner H. Helicobacter pylori infection and serum ferritin: a population-based study among 1806 adults in Germany. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:1014-8.
8. Parkinson AJ, Gold BD, Bulkow L, et al. High prevalence of Helicobacter pylori in the Alaska native population and association with low serum ferritin levels in young adults. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7: 885-8.
9. Cardenas VM, Mulla ZD, Ortiz M, Graham DY. Iron deficiency and Helicobacter pylori infection in the United States. *Am J Epidemiol* 2006; 163: 127-34.
10. Weyermann M, Rothenbacher D, Gayer L, et al. Role of Helicobacter pylori infection in iron deficiency during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 548-53.
11. Choe YH, Kim SK, Hong YC. Helicobacter pylori infection with iron deficiency anaemia and subnormal growth at puberty. *Arch Dis Child* 2000; 82: 136-40.
12. Choe YH, Kwon YS, Jung MK, Kang SK, Hwang TS, Hong YC. Helicobacter pylori-associated iron-deficiency anemia in adolescent female athletes. *J Pediatr* 2001; 139: 100-4.
13. Choi JW. Does Helicobacter pylori infection relate to iron deficiency anaemia in prepubescent children under 12 years of age? *Acta Paediatr* 2003; 92: 970-2.
14. Choe YH, Kim SK, Son BK, Lee DH, Hong YC, Pai SH. Randomized placebo-controlled trial of Helicobacter pylori eradication for iron-deficiency anemia in preadolescent children and adolescents. *Helicobacter* 1999; 4: 135-9.
15. Sarker SA, Mahmud H, Davidsson L, Alam NH, Ahmed T, Alam N, et al. Causal relationship of Helicobacter pylori with iron-deficiency anemia or failure of iron supplementation in children. *Gastroenterology* 2008; 135: 1534-42.
16. Zhang ZW, Patchett SE, Perrett D, Katelaris PH, Domizio P, Farthing MJ. The relation between gastric vitamin C concentrations, mucosal histology, and CagA seropositivity in the human stomach. *Gut* 1998; 43: 322-6.
17. Ciacci C, Sabbatini F, Cavallaro R, et al. Helicobacter pylori impairs iron absorption in infected individuals. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 455-60.
18. Barabino A, Dufour C, Marino CE, Claudiani F, De Alessandri A. Unexplained refractory anemia associated with Helicobacter pylori gastric infection in children: further clinical evidence. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28: 116-9.
19. Mahalanabis D, Islam MA, Shaikh S, et al. Haematological response to iron supplementation is reduced in children with asymptomatic Helicobacter pylori infection. *Br J Nutr* 2005; 94: 969-75.
20. Husson MO, Legrand D, Spick G, Leclerc H. Iron acquisition by Helicobacter pylori: importance of human lactoferrin. *Infect Immun* 1993; 61: 2694-7.
21. Dhaenens L, Szczebara F, Husson MO. Identification, characterization and immunogenicity of the lactoferrin-binding protein from Helicobacter pylori. *Infect Immun* 1997; 65: 514-8.
22. Nakao K, Imoto I, Ikemura N, et al. Relation of lactoferrin levels in gastric mucosa with Helicobacter pylori infection and with the degree of gastric inflammation. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1005-11.
23. Lee JH, Choe YH, Choi YO. The expression of iron-repressible outer membrane proteins in Helicobacter pylori and its association with iron deficiency anemia. *Helicobacter* 2009; 14: 36-9.

## THE MOLECULAR SIGNIFICANCE AND FUNCTIONAL RELEVANCE OF MATRIPTASE-2 MUTATIONS IN THE DEVELOPMENT OF IRON-REFRACTORY IRON DEFICIENCY ANEMIA

A.J. RAMSAY<sup>1</sup>, A. REMACHA<sup>2</sup>, V. QUESADA<sup>1</sup>, A. KWARCIAK<sup>1</sup>, C. LÓPEZ-OTÍN<sup>1</sup>, G. VELASCO<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Instituto Universitario de Oncología. Oviedo.  
<sup>2</sup>Servicio de Hematología. Complejo Hospitalario de Toledo

### Abstract

Matriptase-2 is a proteolytic regulator of iron homeostasis. Prior reports have identified human matriptase-2 mutations in iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA) patients from European, African and African American ancestries. These loss-of-func-

tion mutations include frameshift, splice junction, missense and nonsense mutations that predominantly encode matriptase-2 proteins lacking essential residues for proteolytic activity. The recent works by our laboratory and Silvestri and colleagues have expanded the pre-existing repertoire of known IRIDA mutations and delineated that mutations originating in protease regions other than the catalytic domain have a profound impact on enzyme function. In conjunction with similar stem region mutations observed for corin and TMPRSS3 in individuals with hypertension and congenital deafness respectively, these studies further underscore the importance of the stem region domains for the normal and pathological function of type II transmembrane serine proteases. This mini-review updates our current understanding of the functional relevance of matriptase-2 loss-of-function mutations in IRIDA patients.

### Iron homeostasis

Maintaining iron levels within precise limits is an essential process in mammalian physiology. As the capacity for iron excretion is limited, systemic iron levels are regulated by iron absorption in mature enterocytes of the duodenum and extracellular iron release from macrophages and hepatocytes. This process is exquisitely controlled by the hepatic peptide hormone, hepcidin<sup>1,2</sup>. Hepcidin mediates the internalization and degradation of the iron export molecule ferroportin, located on the surface of intestinal enterocytes, macrophages and hepatocytes, thereby negatively regulating iron entry into the plasma<sup>3</sup>. Consistently, mice deficient in hepcidin<sup>4</sup> and humans with mutations of this gene develop severe iron overload disorders<sup>5</sup>. Conversely, mice with increased transgenic expression of hepcidin in the liver manifest severe iron deficiency anemia<sup>6</sup>. Recent studies have delineated that hepcidin expression is attenuated by the type II transmembrane serine protease (TTSP), matriptase-2 (TMPRSS6). Mice deficient in matriptase-2 (*Tmprss6*<sup>-/-</sup> and *mask* mice) have a marked up-regulation in hepcidin transcription and demonstrate an overt phenotype of alopecia and severe iron deficiency anemia<sup>7,8</sup>. Further, the *Tmprss6*<sup>-/-</sup> mice have reduced protein levels of ferroportin on the basolateral membrane of enterocytes of the duodenum, leading to the retention of iron within these cells. Supplementation of plasma iron levels through subcutaneous delivery of iron dextran effectively rescues the phenotype, reversing the hematological deficiencies and restoring normal hair growth. *In vitro* demonstration of hemojuvelin degradation by matriptase-2 has causally linked this mechanism to negative hepcidin regulation<sup>9</sup>. Hemojuvelin is synthesized by hepato-

cytes as a membrane GPI-linked protein that behaves as a co-receptor for stimulation of hepcidin expression by BMP-2, -4 and -6 *in vitro*<sup>10-12</sup> and BMP-6 *in vivo*<sup>13,14</sup>. Further, a soluble form of hemojuvelin, produced by the liver and skeletal muscle, antagonizes BMP-stimulated hepcidin expression<sup>15</sup>. Consistently, high dose administration of soluble hemojuvelin induces an increase in serum iron levels *in vivo* by suppressing hepcidin production<sup>11</sup>.

### Loss-of-function matriptase-2 mutations

Hepcidin expression is modulated by a variety of physiological stimuli, including inflammation, iron status, erythropoiesis and hypoxia<sup>16</sup>. Further, in accordance with its role in coordinating body iron levels, alterations in the genes encoding hepcidin<sup>5</sup> or its key regulators<sup>17-19</sup> induce iron overload syndromes such as hereditary hemochromatosis (HH). Consistently, HH disorders result from inadequate hepcidin production relative to body iron stores<sup>20</sup>. Conversely, elevated hepcidin levels have been described in iron deficiency anemia patients that are insensitive to oral iron therapy and display an incomplete hematological recovery after parenteral iron administrations, a condition termed iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA)<sup>21</sup>. Reverse genetic studies have discovered that IRIDA patients harbor defects in the *TMPRSS6* gene. Heterozygous and homozygous biallelic human matriptase-2 mutations have now been identified in 17 IRIDA patients from Spanish (Ramsay *et al.*, submitted), French<sup>22</sup>, Italian<sup>23</sup>, Turkish, African, African American<sup>21</sup> and English ancestries<sup>24</sup>. As displayed in Table 1, hematological parameters of IRIDA patients mirror those of *Tmprss6*<sup>-/-</sup> and *mask* mice, including a congenital hypochromic, microcytic anemia, low corpuscular erythrocyte volume, low transferrin saturation and abnormal iron absorption. The mutations, as summarized in Table 1 and Figure 1, include frameshift, splice junction, missense and nonsense mutations. Predominately, the identified mutations, including 1906\_1907insGC, 1813delG, IVS13+1G>A, IVS15-1G>C, 1383delA, IVS6+1G>C, 1179T>G, 1795C>T and 2172\_2173insCCCC encode matriptase-2 proteins which lack essential residues for proteolytic activity. *In vitro*, these matriptase-2 proteins lacking proteolytic residues display an inability to degrade membrane hemojuvelin, and consistently, an inability to suppress hepcidin transcription when co-expressed with hemojuvelin<sup>9</sup>. *In vivo*, over-expression of a protease domain-deficient human matriptase-2 resulted in reduced hemoglobinization in comparison to wild-type human matriptase-2<sup>9</sup>.

Recent studies by our laboratory and Silvestri and colleagues have demonstrated that matriptase-2 pro-

Tabla 1. Hematological parameters of *Trmpss6<sup>-/-</sup>* mice, mask mice and IRIDA patients

	<i>Trmpss6<sup>-/-</sup></i> mice (Folgueras et al.)	"mask" mice (Du et al.)	IRIDA patients (Finberg et al.)	IRIDA patient (Melis et al.)	IRIDA patient (Guillem et al.)	IRIDA patients (Ramsay et al.)	IRIDA patients (Silvestri et al.)
Matriptase-2 allele and encoded protein mutations	null/null	IVS14-2A>G/IVS14-2A>G (C566fs)/(C566fs)	1906_1907 ins GC/1906_1907ins GC (K636fs)/(K636fs) IVS15-1G>C/IVS15-1G>C (D622fs)/(D622fs) 1813de1G/IVS13+1G>A (A605fs)/(E527fs) 1324G>A/1561G>A (G442R)/(D521N) 1065C>A/1383de1A (Y355X)/(E461fs) IVS16+1G>C/not identified (G713fs)/- 2320C>T/not identified (R774C)/-	IVS6+IG>C/IVS6+1G>C (S288fs)/(S288fs)	1179T>G/1795C>T (Y393X)/(R599X)	476C>A & 468C>T/2172_2173insCCCC (A118D)/(P686fs)	1561G>A/1564G>A (D521N)/(E522K)
Hemoglobin	low	low	low	low	low	low	low
Hepcidin levels	High (liver mRNA)	High (liver mRNA)	High (urine protein)	High (urine/serum protein)	High (serum protein)	High (urine protein)	High (serum protein)
Iron absorption	Impaired	Impaired	Impaired	Impaired	impaired	impaired	impaired
Iron stores	ND	high in spleen	ND	normal in liver	ND	normal in liver	ND
MCV	low	low	low	low	low	low	low
Reticulocytes	ND	ND	low	ND	low	ND	ND
Serum iron	low	low	ND	low	low	low	low
Transferrin saturation	low	ND	low	low	low	low	low

For IRIDA patients, "low" refers to values below the standard reference range. "Low" in *Trmpss6<sup>-/-</sup>* and mask mice refers to values significantly lower than wild-type counterparts. Impaired iron absorption was determined by dietary iron uptake (mask mice), duodenal enterocyte iron retention (*Trmpss6<sup>-/-</sup>*) and lack of response to oral iron treatment (IRIDA patients). MCV, mean cell volume; ND, not determined.

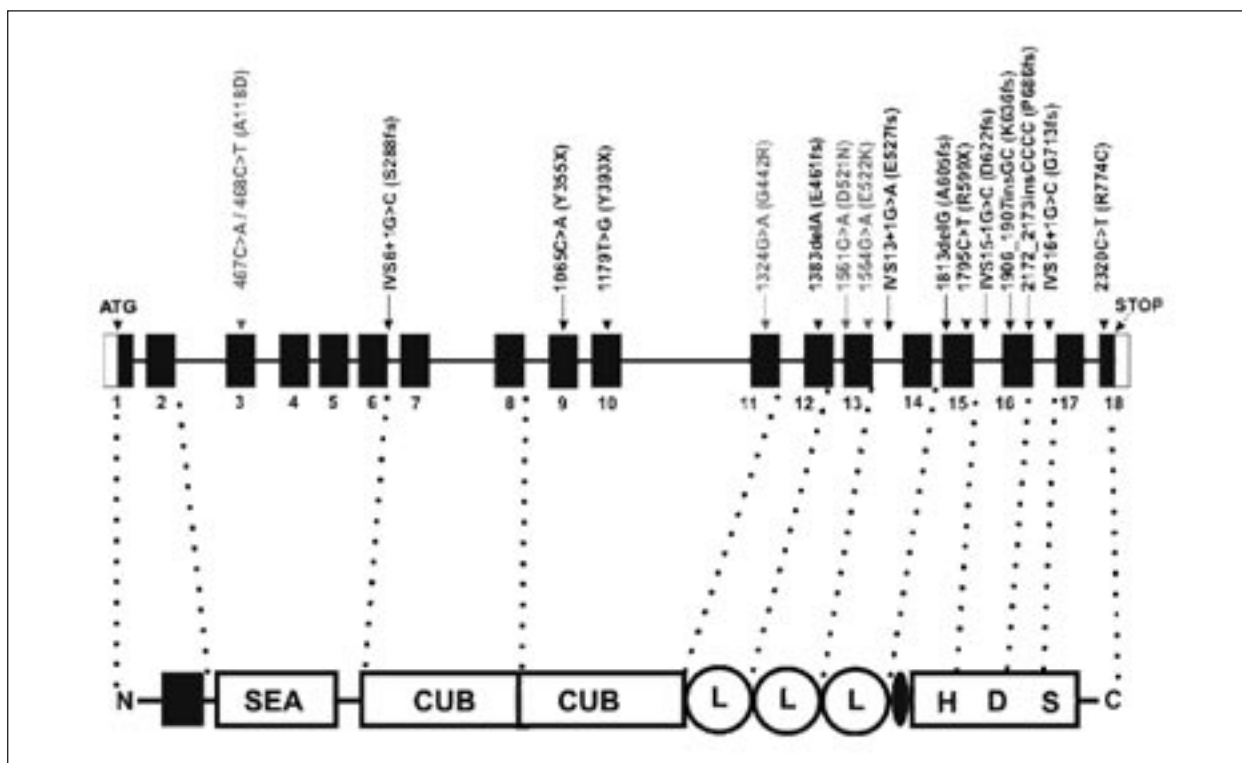


Figura 1. Matriptase-2 gene structure and locations of IRIDA mutations. The upper panel of the figure depicts the genomic organization of matriptase-2 with black and white boxes representing coding and non-coding regions, respectively. All currently identified IRIDA patient mutations are marked with arrows corresponding to their genomic locations. Mutation nomenclatures in black are mutations affecting

to point mutations in the stem region of matriptase-2. The encoded protein is shown in the lower panel. Dashed lines mark exon encoding boundaries for each of the matriptase-2 protein structural domains, including transmembrane (black box), one SEA, two CUB, three LDLa (L), activation (black oval) and proteolytic (boxed HDS).

teins with a functional protease domain but containing the point mutations c.467C>A / c.468C>T (A118D) (Ramsay *et al.*, submitted), c.1561G>A (D521N), c.1564G>A (E522K) or 1324G>A (G442R)<sup>22</sup> in the SEA (sea urchin sperm protein, enteropeptidase, agrin), 2<sup>nd</sup> LDLa (low density lipoprotein receptor class A), 2<sup>nd</sup> LDLa and 2<sup>nd</sup> CUB (Cls/Clr, urchin embryonic growth factor and bone morphogenic protein 1) domains of the stem region respectively, cause loss of enzyme function. Analysis of the less apparent molecular implications of these mutations has revealed that the enzyme maturation process is abolished or impaired by each of the mutations. We have reported previously that homology modeling of the SEA domain mutation (A118D) predicts the forced insertion of an aspartic acid residue into the hydrophobic core of the protein. Further, energy minimizations suggest that this situation leads to destabilization of the h1  $\alpha$ -helix, potentially affecting folding of the SEA domain and as a consequence leading to structural destabilization.

We have performed homology modeling of each of the other identified stem domain point mutations as previously described (Ramsay *et al.*, submit-

ted). The G442R mutation is likely to affect the packing of the CUB domain. Given the difference in size and charge between glycine and arginine, this mutation is expected to be difficult to accommodate in the normal folding of the domain. Unfortunately, residue 442 is located close to the C-terminal tail of this domain, where matriptase-2 is highly divergent with other CUB domain-containing proteins of known structure, making more definitive predictions difficult. Similarly, mutations D521N and E522K are expected to affect the folding of the C-terminal tail of the third LDLa domain of matriptase-2. Both residues form hydrogen bonds with the main chain of nearby residues.

These bonds appear to maintain the shape of the C-terminus of this domain. These mutations might hamper the proper alignment of C509 and C524, thereby disrupting the disulphide bridge pattern of the mutated protein. Further, alanine<sup>118</sup>, aspartic acid<sup>521</sup>, glutamic acid<sup>522</sup> and glycine<sup>442</sup> residues, signifying their potential importance for enzyme function (data not shown). Overall, our homology modeling results in conjunction with previous *in vitro* experiments, suggest that structural alterations in

matriptase-2 stem region domains render the enzyme activation deficient.

Based on their amino acid sequences, TTSPs are likely synthesized as single chain zymogens before proteolytic activation following an arginine or lysine residue present in their highly conserved activation domains<sup>25</sup>. Collectively, the newly described stem domain mutations illustrate the importance of the stem region for the activation of matriptase-2. The stem region of the TTSPs contain mosaics of 1 to 11 protein domains of 6 different types, these are SEA domains, LDLa domains; SR (group A scavenger receptor) domains; frizzled domains; CUB domains; and MAM (a mephrin, A5 antigen, and receptor protein phosphatase  $\mu$ ) domains<sup>25</sup>. The observations of stem domain dependent activation of matriptase-2 are accordant with the maturation process of the TTSPs matriptase and corin. Missense mutations in the 2<sup>nd</sup> frizzled domain of corin impair enzyme activation and abate proteolytic conversion of pro-ANP, potentially contributing to hypertensive disease in humans<sup>26</sup>.

Activation of the highly homologous matriptase requires two sequential endoproteolytic cleavages, the first of which occurs within the SEA domain by an unknown proteolytic activity, and the second within the highly conserved activation cleavage site in the serine protease domain<sup>27</sup>. Furthermore, in addition to several frameshift, splice junction and nonsense mutations reported for TMPRSS3 in patients with nonsyndromic recessive hearing loss, point mutations in the LDLa (D103G) and SR (R109W and C194F) domains have been documented<sup>28</sup> and impart defective enzyme proteolysis in a recombinant assay system<sup>29</sup>.

Activation site cleavage in matriptase requires proteolytic activity, as mutations in any of the residues of the catalytic triad abrogate activation site cleavage<sup>27</sup>. Similarly we have shown that a matriptase-2 mutant truncated after the catalytic histidine, excluding the proteolytic serine residue (2172\_2173insCCCC), displays absent enzyme activation (Ramsay *et al.*, submitted). This suggests that like matriptase, matriptase-2 maturation involves auto-activation, which is corroborated by our prior biochemical characterization describing that bacterially produced recombinant matriptase-2 undergoes auto-activation<sup>30</sup>. Functionally, the disruption of matriptase-2 maturation by the A118D, D521N, E522K and G442R mutations is manifested in an inability to reduce hepcidin transcription as effectively as the wild-type enzyme *in vitro*, concomitant with absent proteolysis of hemojuvelin by D521N and E522K variants and reduced proteolysis by the G442R variant, clarifying the augmentation of hepcidin levels in the IRIDA patients.

## Perspectives

The role of matriptase-2 in iron homeostasis has identified another essential role in mammalian biology for a TTSP family member. Despite structural similarities and shared biochemical traits, TTSPs participate in a diverse range of physiological processes such as blood pressure maintenance, inner ear development, food digestion and epidermal barrier formation. However, of the 17 TTSP members identified in humans, only a few have had their *in vivo* roles delineated. Further, pathogenic mutations like those identified in the *TM-PRSS6* gene of IRIDA patients are found in the genes encoding enteropeptidase, corin, TMPRSS3 and matriptase of patients with the clinical conditions congenital enteropeptidase deficiency, congenital deafness, hypertensive disease and ichthyosis with hypotrichosis, respectively. Therefore, continued *in vivo* characterization of TTSP functional roles is critical, not only for our understanding of normal physiology, but potentially to human disease conditions that may be associated with loss-of-function TTSP mutations.

## Acknowledgements

*Our work is supported by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación-Spain, Fundación M. Botín, and the European Union (FP7-Microenvimet). The Instituto Universitario de Oncología is supported by Obra Social Cajastur-Asturias, Spain.*

## References

1. Camaschella C, Silvestri L. New and old players in the hepcidin pathway. *Haematologica* 2008; 93 (10): 1441-4.
2. Muckenthaler MU. Fine tuning of hepcidin expression by positive and negative regulators. *Cell Metab* 2008; 8 (1): 1-3.
3. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004; 306 (5704): 2090-3.
4. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98 (15): 8780-5.
5. Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J, et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 2003; 33 (1): 21-2.
6. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 (7): 4596-601.
7. Folgueras AR, De Lara FM, Pendas AM, Garabaya C, Rodríguez F, Astudillo A, et al. Membrane-bound serine protease matriptase-2 (*Tmprss6*) is an essential regulator of iron homeostasis. *Blood* 2008; 112 (6): 2539-45.
8. Du X, She E, Gelbart T, Truksa J, Lee P, Xia Y, et al. The serine protease *TMPRSS6* is required to sense iron deficiency. *Science* 2008; 320 (5879): 1088-92.

9. Silvestri L, Pagani A, Nai A, De Domenico I, Kaplan J, Camaschella C. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab* 2008; 8 (6): 502-11.
10. Xia Y, Babitt JL, Sidis Y, Chung RT, Lin HY. Hemojuvelin regulates hepcidin expression via a selective subset of BMP ligands and receptors independently of neogenin. *Blood* 2008; 111 (10): 5195-204.
11. Babitt JL, Huang FW, Xia Y, Sidis Y, Andrews NC, Lin HY. Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J Clin Invest* 2007; 117 (7): 1933-9.
12. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, et al. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet* 2006; 38 (5): 531-9.
13. Meynard D, Kautz L, Darnaud V, Canonne-Hergaux F, Coppin H, Roth MP. Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet* 2009; 41 (4): 478-81.
14. Andriopoulos B, Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grigorevic L, et al. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet* 2009; 41 (4): 482-7.
15. Lin L, Goldberg YP, Ganz T. Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin. *Blood* 2005; 106 (8): 2884-9.
16. De Domenico I, McVey Ward D, Kaplan J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9 (1): 72-81.
17. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996; 13 (4): 399-408.
18. Camaschella C, Roetto A, Cali A, De Gobbi M, Garozzo G, Carella M, et al. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet* 2000; 25 (1): 14-5.
19. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dube MP, et al. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 2004; 36 (1): 77-82.
20. Nemeth E, Ganz T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu Rev Nutr* 2006; 26: 323-42.
21. Finberg KE, Heeney MM, Campagna DR, Aydinok Y, Pearson HA, Hartman KR, et al. Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet* 2008; 40 (5): 569-71.
22. Silvestri L, Guillem F, Pagani A, Nai A, Oudin C, Silva M, et al. Molecular mechanisms of the defective hepcidin inhibition in TMPRSS6 mutations associated with iron-refractory iron deficiency anemia. *Blood* 2009 Apr 8.
23. Melis MA, Cau M, Congiu R, Sole G, Barella S, Cao A, et al. A mutation in the TMPRSS6 gene, encoding a transmembrane serine protease that suppresses hepcidin production, in familial iron deficiency anemia refractory to oral iron. *Haematologica* 2008; 93 (10): 1473-9.
24. Guillem F, Lawson S, Kannengiesser C, Westerman M, Beaumont C, Grandchamp B. Two nonsense mutations in the TMPRSS6 gene in a patient with microcytic anemia and iron deficiency. *Blood* 2008; 112 (5): 2089-91.
25. Ramsay AJ, Hooper JD, Folgueras AR, Velasco G, López-Otin C. Matriptase-2 (TMPRSS6): a proteolytic regulator of iron homeostasis. *Haematologica* 2009.
26. Wang W, Liao X, Fukuda K, Knappe S, Wu F, Dries DL, et al. Corin variant associated with hypertension and cardiac hypertrophy exhibits impaired zymogen activation and natriuretic peptide processing activity. *Circ Res* 2008; 103 (5): 502-8.
27. Oberst MD, Williams CA, Dickson RB, Johnson MD, Lin CY. The activation of matriptase requires its noncatalytic domains, serine protease domain, and its cognate inhibitor. *J Biol Chem* 2003; 278 (29): 26773-9.
28. Guipponi M, Antonarakis SE, Scott HS. TMPRSS3, a type II transmembrane serine protease mutated in non-syndromic autosomal recessive deafness. *Front Biosci* 2008; 13: 1557-67.
29. Lee YJ, Park D, Kim SY, Park WJ. Pathogenic mutations but not polymorphisms in congenital and childhood onset autosomal recessive deafness disrupt the proteolytic activity of TMPRSS3. *J Med Genet* 2003; 40 (8): 629-31.
30. Velasco G, Cal S, Quesada V, Sánchez LM, López-Otin C. Matriptase-2, a membrane-bound mosaic serine proteinase predominantly expressed in human liver and showing degrading activity against extracellular matrix proteins. *J Biol Chem* 2002; 277 (40): 37637-46.