

Hepcidina Sérica en Donantes de Sangre y Pacientes con Alteraciones en el Metabolismo Del hierro

Serum Hepcidin in Blood Donors and Patients with Impaired Iron Metabolism

Alejandro Gómez Alvarez^{1,2},
Maria Isabel Villa Palacio¹
and
Paola Andrea Acevedo Toro¹

- 1 Grupo de Hematopatología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
- 2 Estudiante de Maestría en Microbiología y Bioanálisis, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Resumen

Introducción: la hepcidina es la proteína encargada de regular el metabolismo del hierro en el organismo. Este control lo realiza mediante un manejo entre la absorción y exportación de éste elemento de la célula. Lo anterior se lleva a cabo con el fin de mantener la homeóstasis entre el consumo, pérdida y reservas de hierro. La determinación de hepcidina ha ganado importancia, debido a que permite complementar el diagnóstico de patologías en las que se presenten alteraciones en el metabolismo del hierro, permitiendo tener información no sólo de los depósitos, sino de la absorción y disponibilidad de este elemento.

Metodología: Estudio descriptivo transversal. La población de estudio estuvo conformada por 85 donantes de sangre y 74 pacientes aplicando criterios de inclusión y exclusión. A estas poblaciones se les realizó hemograma automatizado y se evaluó ferritina, hierro total y transferrina mediante el método de quimioluminiscencia, colorimetría e inmunturbidimetría respectivamente. Se utilizó el software estadístico SPSS statistics versión 21®.

Resultados: con respecto al género en la población de donantes de sangre, existe una diferencia estadísticamente significativa en los valores de hepcidina ($p < 0,01$), hemoglobina ($p = 1,725-2,584$) según prueba de t-student; ferritina ($p = 0,000$) y transferrina ($p = 0,01$) mediante prueba de U de Mann Whitney. Así mismo, se encontró que en la población de pacientes los valores de hepcidina ($p = 0,000$) transferrina ($p = 0,000$), ferritina ($p = 0,000$) y hemoglobina ($p = 0,000$) presentaron una diferencia estadísticamente significativa según el diagnóstico. En ambas poblaciones se encuentra una correlación positiva entre los valores de hepcidina y ferritina. Según el modelo de regresión, los valores de hepcidina ($p = 0,000$), ferritina ($p = 0,000$) y transferrina ($p = 0,000$), son exclusivos del diagnóstico.

Conclusión: La medición de hepcidina se propone como una prueba de gran utilidad para realizar diagnósticos diferenciales entre entidades que presenten alteraciones en el metabolismo del hierro.

Palabras clave: Hepcidina, anemia ferropénica, anemia inflamatoria

Summary

Introduction: Hepcidin protein is responsible for regulating the metabolism of iron in the body. This control performed by monitoring the uptake and export of this

Correspondencia:

Alejandro Gómez Alvarez

✉ alekhos87@hotmail.com

Carrera 51B # 69-13, Banco de Sangre
Escuela de Microbiología, Medellín,
Colombia

Tel: +573105002289

cell. This is done in order to maintain homeostasis between consumption, loss and iron stores. The determination of hepcidin has become important, because it allows complement the diagnosis of diseases in which changes occur in iron metabolism, allowing having information not only on deposits, but the absorption and availability of this item.

Methodology: Cross-sectional study. The study population consisted of 85 blood donors and 74 patients applying inclusion and exclusion criteria. These populations were subjected to automated blood count and evaluated ferritin, transferrin and total iron by chemiluminescence method, colorimetry and immunoturbidimetry respectively. SPSS statistical software version statistics 21[®] was used.

Results: Regarding gender in the population of blood donors, there is a statistically significant difference in the hepcidin levels ($p < 0.01$), hemoglobin ($p = 1.725$ to 2.584) according to test t -student; ferritin ($p = 0.000$) and transferrin ($p = 0.01$) using U test Mann Whitney. Also, it was found that in the patient population the hepcidin levels ($p = 0.000$) transferrin ($p = 0.000$), ferritin ($p = 0.000$) and hemoglobin ($p = 0.000$) there is also a statistically significant difference according to the diagnosis. In both populations it is that there is a positive correlation between the values of hepcidin and ferritin. According to the regression model, the hepcidin levels ($p = 0.000$), ferritin ($p = 0.000$) and transferrin ($p = 0.000$), they are unique diagnosis.

Conclusion: The measurement of hepcidin is proposed as a useful test for differential diagnosis between entities that present alterations in iron metabolism.

Keywords: Hepcidin; Iron deficiency anemia; Inflammatory anemia

Fecha de recepción: Feb 28, 2016; **Fecha de aceptación:** Mar 08, 2016; **Fecha de publicación:** Mar 13, 2016

Introducción

La hepcidina, es un polipéptido secretado por el hígado, el gen implicado en su síntesis es HAMP (*péptido antimicrobiano hepático*). La función de esta proteína consiste principalmente en la regulación de la absorción del hierro a través del intestino delgado, por medio de la citocromo B duodenal y el DMT1 (Transportador de metales divalentes 1) [1,2]. Así mismo, ejerce un control negativo en los niveles de hierro en circulación, es decir, cuando el hierro está en altas concentraciones, se libera la hepcidina con el fin de bloquear la absorción de este en el intestino, además de fosforilar y degradar la ferroportina, internalizándola e impidiendo que el hierro sea exportado de la célula [3-5]. Por el contrario cuando el hierro en sangre está disminuido, el organismo detiene la liberación de hepcidina, facilitando la absorción y exportación del hierro intracelular, permitiendo así su biodisponibilidad [1,2,4].

La producción de hepcidina es regulada por algunas vías que promueven o inhiben la síntesis del gen HAMP [1,5], entre las que se encuentran la vía de la BMP (*proteína morfogénica ósea*), la cual pertenece a la superfamilia de citoquinas TGF- β (*factor transformante de crecimiento β*), a la fecha es uno de los mecanismos moleculares más estudiados [5,6]. La función de la BMP es aumentar la síntesis del gen HAMP cuando los niveles de hierro sérico están aumentados y viceversa [1,5,6]. Esta vía se ve afectada en enfermedades como la hemocromatosis hereditaria

tipo 1, enfermedad que se produce por una mutación del gen HFE (*High Iron Fe*). Dicha mutación, produce una inadecuada regulación de la vía BMP, impidiendo que se reconozcan los cambios en los niveles de hierro sérico, por lo cual se produce una disminución de la síntesis de hepcidina, lo que conlleva a una sobreexpresión de la ferroportina, produciendo un aumento de los niveles de hierro séricos generados por un aumento en su absorción [7-9].

Otra vía involucrada en regular la producción de hepcidina es la denominada JAK (Janus Kinasa) que promueve la síntesis del gen HAMP por medio del reconocimiento de citoquinas proinflamatorias como la IL-1, IL-6, el TNF- α , entre otras, o moléculas de origen bacteriano como los lipopolisacáridos [5,10]. Es el caso de enfermedades como la anemia de tipo inflamatorio [11,12], en la cual se da una alta producción de moléculas proinflamatorias, generando un aumento en la síntesis del gen HAMP, elevando los niveles de hepcidina en sangre, lo que conlleva a una disminución en la absorción del hierro duodenal y ocasiona una inadecuada exportación de este elemento por degradación de la ferroportina. Como consecuencia, en estos pacientes los niveles de ferritina están normales o aumentados [8,13].

Por su parte, la inhibición de la producción de hepcidina está mediada principalmente por la eritropoyesis, es decir, cuando hay demanda de eritrocitos, como en los estados de anemia o hipoxia, se da un estímulo para la síntesis de eritropoyetina,

llevando a un bloqueo en la producción de hepcidina para generar un aumento en los niveles séricos de hierro, y lograr así una eritropoyesis efectiva. Adicionalmente se ha planteado que durante la eritropoyesis, el eritroblasto en su proceso de maduración produce GDF15 (factor de diferenciación de crecimiento 15), el cual tiene un efecto inhibitorio frente a la producción de hepcidina [5,6]. Es por lo anterior que en casos como la anemia ferropénica, causada por pérdidas sanguíneas sin compensación, ingesta inadecuada ó problemas en la absorción, se presentan niveles disminuidos de hierro, generando la necesidad de aumentar la absorción y exportación de este. Es así como en estos pacientes se encuentran los niveles de hepcidina disminuidos, con el fin de compensar la ausencia de hierro y permitir la biodisponibilidad del hierro de reserva [14].

La evaluación para el diagnóstico de las anteriores patologías se basa en el estudio del perfil de hierro que comprende la determinación de ferritina, transferrina y sideremia [15,16]. Sin embargo en los últimos años se ha planteado la realización de nuevas pruebas, como la determinación de hepcidina, que permitan ampliar el perfil diagnóstico de rutina [15]. Por lo que se plantea la necesidad de estandarizar la medición del péptido en nuestra población, con el fin de implementar la prueba en el esquema de diagnóstico de los pacientes con alteraciones en el metabolismo del hierro. Con lo anterior se pretende utilizar la hepcidina como examen de laboratorio capaz de diferenciar anemias de tipo inflamatorio de pacientes con anemia por deficiencia de hierro [17].

En este sentido y luego de la revisión de artículos de investigación originales publicados en Pubmed, Lilacs, Scielo, Wiley, e-Blood, Elsevier y Science Direct donde se emplearon términos de búsqueda como: hepcidina, metabolismo del hierro, anemia, anemia inflamatoria, deficiencia de hierro, hemocromatosis y sus equivalentes en inglés, en Colombia y Latinoamérica, se pudo concluir que hasta el momento no se han realizado investigaciones sobre los niveles de hepcidina en la población. El objetivo del presente estudio es determinar la relación entre la hepcidina y los parámetros de laboratorio que evalúan el metabolismo del hierro en donantes de sangre y en pacientes con desórdenes relacionados con el metabolismo del hierro. Lo anterior se realiza con el fin de dar a conocer los primeros hallazgos sobre los valores de esta proteína en la población.

Metodología

El presente estudio se cataloga como un estudio descriptivo transversal.

Población de estudio

Donantes de sangre

Se recolectaron entre los años 2013 y 2014, 85 donantes de sangre que asistieron al Banco de Sangre de la Universidad de Antioquia, este se definió como grupo control. El cálculo del tamaño de la muestra se estimó por conveniencia y el muestreo se realizó de forma aleatoria, alcanzando un número similar entre hombres y mujeres. Como criterio de inclusión se definió: cumplir con los requisitos establecidos por la **Guía para la**

selección y **atención de donantes de sangre** en Colombia para ser aceptados para realizar la donación [18]. Como criterio de exclusión se definió la alteración de alguno de los parámetros de laboratorio relacionados con la evaluación del metabolismo del hierro.

Pacientes

Se consolidó un grupo total de 74 pacientes, a partir de un muestreo por conveniencia, sin tener en cuenta el género, e incluyendo un rango de edad entre 18 y 65 años. Los criterios de inclusión se definieron como: pacientes con diagnóstico de patologías relacionadas con alteraciones en el metabolismo del hierro (anemia ferropénica, anemia por enfermedades crónicas y hemocromatosis); no suministro de tratamiento de suplemento de hierro [19,20]. Como criterio de exclusión se estableció obtener resultados normales en el hemograma y demás parámetros de evaluación del metabolismo del hierro los cuales fueron analizados de acuerdo a la patología del paciente.

La población de pacientes fue clasificada por grupos de acuerdo a la enfermedad que presentaban y se determinaron los analitos establecidos para el estudio. Además en ambas poblaciones para la aceptación de participar en el estudio se procedió a la firma del consentimiento informado.

Toma de muestra

Las muestras para ambas poblaciones se recolectaron en dos tubos secos y un tubo con anticoagulante EDTA a partir de venopunción usando sangre venosa; las muestras fueron obtenidas entre las 7 y las 10 am, debido a las variaciones circadianas que presenta la hepcidina, como lo sugiere los estudios de Galesloot y cols 2011 y Kroot y cols 2009 [19,21]. Las muestras para hemograma, ferritina, sideremia y transferrina se procesaron entre las primeras 4 horas luego de la recolección. Durante el tiempo de recolección, las muestras para hepcidina se almacenaron a -30°C.

Determinaciones De Laboratorio

Determinación de la hepcidina sérica

Se realizó mediante el Kit DRG Hepcidin-25 (bioactive)*, inmunoensayo enzimático utilizado para la determinación cuantitativa de la isoforma 25 de la hepcidina en suero y plasma, este kit sólo se usa con fines investigativos y el registro INVIMA se expide sólo con este fin. La linealidad del método va hasta 390.6 nM/L, no se conocen medicamentos que alteren la medición de ésta proteína, la sensibilidad analítica del kit es <0.9765 nM/L. Los reactivos se trataron de acuerdo a las indicaciones del inserto, con la reconstitución adecuada. La lectura se realizó a 460 nm, con corrección de interferencia a 620 nm. Además se calcula la gráfica de 4 PL (Parameter Logistic), curva más indicada para el cálculo de la concentración de los estándares [22].

Hemograma completo

A cada participante se le realizó un hemograma automatizado en el equipo **Advia 2120I Siemens**. Este equipo utiliza los principios de citometría de flujo y enfoque hidrodinámico para el conteo de células, y colorimetría para la determinación de hemoglobina. Se cumplieron todos los controles de calidad definidos para el

Tabla 1 Valores de laboratorio estandarizados para el Laboratorio Clínico de la IPS Universitaria sede clínica León XIII para los diferentes analitos medidos en el estudio.

Parámetros		Intervalo Biológico de Referencia	Unidades
Hemoglobina	Hombres	13.5 - 18	g/dL
	Mujeres	12 - 16	
Hematócrito	Hombres	40 - 54	%
	Mujeres	38 - 48	
Transferrina		200 - 360	mg/dL
Hierro total	Hombres	59 - 158	ug/dL
	Mujeres	37 - 145	
Ferritina	Mujeres entre 17-60 años	13-150	ng/ml
	Hombres entre 20-60 años	30-400	

equipo al realizar los análisis.

Determinación de la ferritina

Para la determinación cuantitativa de la ferritina en suero se usó la metodología de quimioluminiscencia. Procesadas en el equipo **Advia centauro XP Siemens®**. Se cumplieron todos los controles de calidad definidos para el equipo al realizar los análisis.

Determinación de la transferrina

Para la determinación cuantitativa in vitro de transferrina, se usó la prueba de inmunturbidimetría en suero humano en el equipo **Dimension RXL Max Siemens®**.

Determinación de hierro total

Se realizó determinación cuantitativa de hierro mediante ensayo colorimétrico para en suero humano usando el equipo **Dimension RXL Max Siemens®**.

Valores de laboratorio estandarizados para un el Laboratorio Clínico de la IPS Universitaria sede clínica León XIII para los diferentes analitos medidos en el estudio (**Tabla 1**).

Consideraciones éticas y descripción de riesgos potenciales

La actual investigación fue aprobada mediante acta 13-08-477 evaluado del comité de ética de la Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia. La investigación se siguió bajo las normas deontológicas reconocidas por la declaración de Helsinki para la investigación clínica en humanos [23,24]. Dicha investigación se clasifica de riesgo mínimo, debido a que no se produjo daño de ningún tipo en los participantes.

Plan de análisis

Se utilizó el software estadístico SPSS statistics versión 21®. Los valores de hepcidina en los donantes de sangre se definieron según el test de Anova, se utilizó la técnica de coeficientes de correlación de Spearman en ambas poblaciones para relacionar los valores de hepcidina y los demás analitos. En el grupo de pacientes se utilizó la técnica de “diferencia mínima significativa

en comparaciones múltiples” y “comparaciones múltiples con corrección de Bonferroni” para comparar los valores de los diferentes analitos en los grupos de pacientes. Para el ajuste de variables confusoras se usó un modelo de regresión.

Resultados

Población De Donantes

Características de la población de donantes de sangre

Población conformada por 85 donantes de sangre, de los cuales 41 (48.2%) fueron hombres con una edad media de 36±11 años, y 44 (51.8%) mujeres con una edad media de 33±13 años.

Medición de parámetros de laboratorio clínico

La media de la concentración de los analitos en hombres y mujeres respectivamente fue: Hemoglobina: 16 g/dL y 13.8 g/dL; ferritina: 167.5 ng/mL y 41.2 ng/mL; hierro total: 98 µg/dL y 81 µg/dL; transferrina: 244 mg/dL y 274 mg/dL.

Según los resultados anteriores, se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre el género y la concentración de hemoglobina ($p=1.725-2.584$) según prueba de t-student; ferritina ($p= 0.000$) y transferrina ($p=0.01$) mediante prueba de U Mann Whitney; mientras que la concentración de hierro total no mostró diferencias estadísticamente significativas (El estadístico es significativo en el $p<0.01$).

Comportamiento de la hepcidina sérica según la edad y género

Se divide la población de donantes de sangre en tres grupos etarios establecidos por el DANE en el [25]: adolescentes (menos de 20 años), adultos jóvenes (21 y 45 años) y adultos medios (mayores de 45 años). La variabilidad de la hepcidina según el test de Anova, no fue estadísticamente significativas en los tres grupos ($p=0.681$). Por el contrario, al evaluar el género, si se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.01$) según prueba de t-student). Los valores de hepcidina se muestran en la **Tabla 2**.

Correlación de la hepcidina sérica con respecto a los diferentes parámetros de laboratorio

Se observó una correlación positiva entre los valores de hepcidina y la ferritina ($p=0.007$; Spearman's Rho=0.719). Por el contrario se muestra una correlación negativa entre la hepcidina y la transferrina ($p=0.007$; Spearman's Rho=-0.301). Además de eso, la hemoglobina tuvo una débil correlación con la hepcidina ($p=0.01$; Spearman's Rho=0.291), impidiendo establecer una relación entre estas dos variables. Finalmente, no hubo correlación entre los valores de hierro total y la hepcidina ($p=0.065$) (El estadístico es significativo $p<0.01$).

Población De Pacientes

Características de la población de pacientes

Población conformada por 72 participantes de los cuales 27 (36.5%) correspondieron a hombres y 47 (63.5%) mujeres. Con una edad media de 45±13 años.

La frecuencia de las enfermedades en el grupo de pacientes fue de 50% (n=37) insuficiencia renal crónica, 18.9% (n=14) tumores sólidos, 25.7% (n=19) anemia ferropénica y en menor proporción con un 5.4% (n=4) hemocromatosis.

Comparación de hepcidina entre los pacientes y los donantes de sangre

Al comparar los valores de hepcidina entre los donantes de sangre que sirvieron como grupo control y los diferentes grupos de pacientes, se evidenció una diferencia estadísticamente significativa. Mostrando que los valores de hepcidina más altos están en los pacientes con insuficiencia renal crónica, y los valores más bajos de este péptido los tienen los pacientes con anemia ferropénica (Tabla 3).

Correlación bioquímica entre la hepcidina y los diferentes analitos en pacientes

En los pacientes con insuficiencia renal, la hepcidina muestra una correlación positiva con los valores de ferritina ($p=0.002$; Spearman's $Rho=0.491$) al igual que los pacientes con tumores sólidos ($p=0$; Spearman's $Rho=0.829$). En este último grupo también se evidenció una correlación negativa entre los valores de hepcidina y transferrina ($p=0.001$; Spearman's $Rho=-0.785$).

En el grupo de pacientes con anemia por deficiencia de hierro, la hepcidina muestra una débil correlación con los valores de ferritina ($p=0.047$).

Por último en el grupo de los pacientes con hemocromatosis, la hepcidina no mostró correlación con ninguno de los diferentes analitos medidos en el estudio.

Modelos de regresión para el ajuste de las variables confusoras

Como se puede evidenciar en la Tabla 4, según el modelo de regresión, las diferencias entre los niveles de ferritina y

Tabla 2 Niveles de hepcidina sérica según género en los donantes de sangre.

		n	Mediana hepcidina sérica (nM)	95% IC	
				Percentil 2.5	Percentil 97.5
Género	Masculino	35	5.73	1.71	13.3
	Femenino	43	3.94	1.67	11.3

n: número de donantes después de excluir los que presentaron valores aberrantes

IC 95%: Intervalo de confianza 95%

Valores de hepcidina usados para comparar con la población de pacientes

Tabla 3 Comparaciones entre los valores de hepcidina: pacientes versus donantes de sangre.

	Grupo					Valor p
	Insuficiencia renal crónica	Tumores sólidos	Anemia ferropénica	Hemocromatosis	Donantes de sangre	
	Me	Me	Me	Me	Me	
Hepcidina nM	110.6 (35.4-145)	21.2 (7.5-59.6)	4.2 (2.9-5.6)	6.5 (3.7-7.7)	12.8 (8.6-26.4)	<0.001 [¥]

Comparaciones múltiples con corrección de Bonferroni entre los valores de hepcidina según diagnóstico (comparación de medianas)

¥: Kruskal Wallis.

Me: Mediana (percentil)

hepcidina de cada grupo de pacientes se deben exclusivamente a la enfermedad y las diferencias en los niveles de transferrina se deben no sólo al diagnóstico, sino que obedece a los valores diferenciales entre hombres y mujeres.

Comparación entre los diferentes parámetros analizados en la población de pacientes

Al evaluar los valores obtenidos en las mediciones de los analitos entre los diagnósticos, se puede evidenciar que existen diferencias significativas entre los valores medios de hemoglobina de pacientes con insuficiencia renal, anemia ferropénica y hemocromatosis; así mismo entre los valores de hemoglobina de pacientes con tumores y hemocromatosis. La transferrina presenta diferencias significativas en todos los diagnósticos.

Además, se pueden observar diferencias estadísticamente significativas entre los valores de hepcidina en todos los grupos de pacientes; diferencias estadísticamente significativas de ferritina en pacientes con anemia ferropénica y tumores sólidos, insuficiencia renal y hemocromatosis. Igualmente los valores de hierro total presentaron diferencias entre el grupo de hemocromatosis y los demás diagnósticos [6] (Tabla 5).

Discusión

Este estudio presenta los resultados de la primera investigación realizada en Colombia disponible en la literatura biomédica sobre la determinación de hepcidina en donantes de sangre y pacientes diagnosticados con alteraciones en el metabolismo del hierro.

En el grupo de donantes de sangre con relación a los resultados de hemoglobina y ferritina, estuvieron en el rango normal, concordando con los encontrados en los estudios de Mantilla y cols 2011 y 2014 [16,26] donde también determinaron el perfil hematológico y las reservas de hierro en una población de donantes de sangre repetitivos. Sin embargo, los valores de ferritina del grupo control del actual estudio estuvieron por encima de la mediana que indica el estudio antes mencionado, probablemente debido a que esta población no pertenecía al grupo de donantes repetitivos. El hierro total y transferrina, corresponden con los valores dados por Burtis y cols 2012, estudio en el cual se reportan valores de estos analitos en una población normal [27].

Con respecto a los valores de hepcidina, hemoglobina y ferritina en el grupo de donantes de sangre, como era de esperarse los hombres presentaron valores superiores para estos analitos

Tabla 4 Modelo de regresión para el ajuste de las variables confusoras.

A			
Modelo	Coeficientes no estandarizados		Valor de p
	B		
1	(Constante)	1,193,987	0
	Sexo	-125,909	0.378
	Diagnóstico	-280,438	0
Variable dependiente: Ferritina ng/mL			
B			
Modelo	Coeficientes no estandarizados		Valor de p
	B		
1	(Constante)	56,91	0.02
	Sexo	33,362	0.021
	Diagnóstico	51,217	0
Variable dependiente: Transferrina mg/dL			
C			
Modelo	Coeficientes no estandarizados		Valor de p
	B		
1	(Constante)	170,793	0
	Sexo	-22,547	0.098
	Diagnóstico	-39,343	0
Variable dependiente: Hepcidina nM			

Regresión lineal para ajuste de variables confusoras donde se muestran los analitos que tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos de pacientes: **A:** variable dependiente: Ferritina; **B:** variable dependiente: transferrina; **C:** variable dependiente: Hepcidina

Tabla 5 Comparaciones entre los diferentes analitos analizados en pacientes.

	Diagnóstico								
	Insuficiencia renal crónica		Tumores sólidos		Anemia ferropénica		Hemocromatosis		Valor p
	Media	Me	Media	Me	Media	Me	Media	Me	
Hemoglobina g/dL	9.3±1.3	9.3 (8.6-10.4)	10.1±2.2	10.5 (7.9-12)	11.5±1.9	11.7 (10.3-13)	16.0±1.6	16 (14.8-17.3)	0.000
Ferritina ng/mL	746.3±742.4	561 (358-784)	408.5±382.3	368.6 (136-513)	17.2±33.2	5.8 (4.3-19)	189.9±158.2	148 (75.8-304)	0.000
Transferrina mg/dL	156.6±37.0	156 (137-176)	193.8±41.1	189.5 (158-199)	312.1±68.3	306 (258-348)	219.8±18.4	223 (204.5-235)	0.000
Hierro Total ug/dL	55.2±36.7	51 (31-69)	63.2±29.6	64.5 (37-76)	58.7±51.6	38 (19-90)	117.3±39.2	120.5 (89.5-145)	0.05
Hepcidina nM	101.8±68.5	110.6 (35.4-145)	42.2±48.5	21.2 (7.5-59.6)	5.3±5.6	4.2 (2.9-5.6)	5.7±3.1	6.5 (3.7-7.7)	0.000

Diferencia mínima significativa (DSM) comparaciones múltiples entre los valores medios hemoglobina y transferrina según diagnóstico (comparación de medias)

Comparaciones múltiples con corrección de Bonferroni entre los valores Ferritina, hierro total y hepcidina según diagnóstico (comparación de medianas)

Me: Mediana, DS: Desviación estándar.

con respecto al grupo de las mujeres. Hallazgos similares se reportaron en los estudios Grebenchtchikov y cols 2009, Itkonen y cols 2012 y Wolff y cols 2013 [28-30]. Lo anterior puede deberse a que las mujeres al presentar el período menstrual, generan una disminución en los niveles de hierro; por consecuencia, los requerimientos en la absorción de este elemento son más altos, provocando una disminución de la hepcidina, lo que genera una mayor absorción del hierro a nivel duodenal, además una adecuada exportación del hierro por parte de la ferroportina [4].

Los valores de hepcidina en la población de donantes de sangre

fueron similares a los encontrados en otros estudios como el de Wolff y cols 2013 (Hombres: 2.1-15.1 nM y Mujeres: 1.6–15.6 nM) e Itkonen y cols 2012 (Hombres: 1.1-15.6 nM y Mujeres: 0.7-16.8 nM) [28,29], estudios en los cuales se usó para la determinación de hepcidina cromatografía líquida con espectrometría de masas [29,31]. Lo anterior muestra la adecuada correlación que tiene la ELISA competitiva usada en este estudio, con respecto a las técnicas moleculares [19,30,32], además, cabe resaltar que esta ELISA es un método de fácil estandarización e implementación. Y como se mencionó anteriormente posee una sensibilidad de <0.9765 nM/L, lo que lo hace una técnica adecuada para

la determinación de este péptido, Asimismo, es una técnica idónea a la hora de procesar grandes cantidades de muestras [32]. Lo anterior evidencia, la importancia que ha cobrado la determinación de la hepcidina y de cómo se han generado técnicas cada vez más accesibles para su medición.

Con relación a las variaciones observadas según grupo etario Itkonen y cols 2012 y Galesloot y cols 2011 en su estudio, realizaron determinación de hepcidina en hombres y mujeres, clasificando estas últimas por su etapa hormonal [19,28]. En dichos estudios, se muestra que las mujeres en edad reproductiva presentan una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los hombres en relación a los valores de este péptido, sin embargo, las mujeres que están en la etapa de menopausia, presentan valores de hepcidina similares a los de los hombres. Lo anterior se explica, en que las mujeres que están en la menopausia, al no tener el período menstrual, sus requerimientos en la absorción de hierro disminuyen [19]. En el actual estudio, dicha diferencia no se observó, en parte debido a que en nuestro estudio, el promedio de la edad en el grupo de mujeres fue de 33 años \pm 13, poniendo a nuestra población de mujeres en etapa reproductiva. Por lo anterior, se sugiere un estudio posterior en el cual se determine la concentración de hepcidina, teniendo en cuenta la etapa hormonal en la que se encuentren las participantes, esto con el fin de establecer un IBR para la hepcidina en diferentes etapas hormonales en nuestra población.

Con relación al grupo de pacientes, los valores de hepcidina, ferritina, hierro total y transferrina, presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes diagnósticos, confirmando que de acuerdo a la fisiopatología de cada una de las enfermedades estudiadas, el comportamiento de los analitos se espera que sea diferente [14]; es el caso de enfermedades como la anemia por deficiencia de hierro, la cual se produce principalmente por una disminución en la concentración del hierro debido en parte a una mala absorción, un bajo consumo y/o a pérdidas de éste elemento en los períodos menstruales [14], lo que genera una disminución en la concentración de hepcidina, con el fin de aumentar la absorción del hierro, asimismo se produce una disminución en la concentración de ferritina [14]. Además, en este tipo de pacientes se encontraron niveles de transferrina aumentados, lo anterior se genera con el fin de captar el hierro que es exportado de la célula y llevarlo a médula ósea para la eritropoyesis. Estos hallazgos concuerdan con lo que expone también Miller 2013 [14].

Por su parte en la anemia, de tipo inflamatorio, se produce una inadecuada absorción del hierro, en este caso debida al aumento en los niveles de moléculas proinflamatorias, las cuales estimulan la producción de la hepcidina, en nuestro estudio esto se refleja en los pacientes con insuficiencia renal y tumores sólidos donde los niveles de hepcidina se encontraron elevados (Tablas 2 y 5). Lo anterior conlleva a una disminución en la absorción del hierro, y una inadecuada exportación de éste elemento, lo que lleva también a un aumento en la concentración de ferritina. Los anteriores hallazgos concuerdan con los reportados por Miller 2014 y Nemeth y cols 2014, los cuales hablan de las diferencias que se deben tener en cuenta al evaluar estas pruebas y de cómo cada una aporta para un diagnóstico diferencial [11,14].

Con relación al valor de la transferrina, se puede observar que en este grupo de pacientes se encuentra disminuida, generado posiblemente por la disminución del hierro sérico, y al aumento en las citoquinas proinflamatorias [11].

Adicionalmente, se ha descrito que en pacientes con insuficiencia renal, en los cuales se encontraron los niveles de hepcidina aumentados, que existen eventos que exacerban la anemia tales como: una disminución en la producción de eritropoyetina; una pérdida de eritrocitos inducida por el proceso de diálisis; sumado a esto, un aumento de los estados de inflamación debido a paso de la sangre por las membranas de diálisis [33]. Por lo anterior, autores como Sedlackova y cols 2013, proponen como parte del tratamiento para este aumento de la hepcidina, el uso de filtros de diálisis para filtrar esta proteína y así disminuir sus niveles [33].

Por otro lado, al comparar los valores de hepcidina de este grupo, con los donantes de sangre, se evidencian diferencias estadísticamente, observándose un aumento en los niveles de hepcidina, con respecto al grupo control; los hallazgos concuerdan con los obtenidos por Sedlackovay cols 2013, donde evaluaron al igual que en nuestro estudio un grupo control frente a un grupo de pacientes con esta patología, los cuales presentaron valores de hepcidina aumentados [33]. La misma situación se presentó en los pacientes con tumores sólidos, los cuales padecen también de anemia de tipo inflamatorio. Lo anterior se debe a que en los pacientes con este tipo de anemia, existe una producción de citoquinas proinflamatorias generadas por la presencia de las células que están ocasionando el tumor, además, los esquemas de tratamiento usados, los cuales ayudan al aumento de este tipo de moléculas. Todo lo anterior lleva a que se produzca un aumento en la producción de hepcidina [33].

De acuerdo a lo anterior, se propone la realización de nuevos estudios donde se tenga en cuenta también la medición de marcadores de inflamación, con el fin de implementar protocolos como los que plantean Barbra y cols 2010, los cuales proponen que: una Proteína C reactiva (PCR) baja y unos niveles de hepcidina bajos, se asocian a un paciente con una posible anemia por deficiencia de hierro; en cambio si la PCR está aumentada y la hepcidina aumentada, se asocia a anemia de tipo inflamatorio; si el paciente está ante un resultado de la PCR disminuido y la hepcidina aumentada, puede deberse a una anemia de tipo mixto [34].

En contraste, los pacientes con hemocromatosis, presentaron valores de hepcidina disminuidos con respecto a los donantes sanos y a los pacientes con anemia de tipo inflamatorio; lo anterior, se debe a que la mutación del gen HFE, imposibilita que se lleve a cabo el *feedback* para aumentar la producción de hepcidina e impedir la absorción de hierro [35], dando como resultado un aumento descontrolado del hierro, lo que produce un aumento en los niveles de hierro total y hemoglobina, evidenciándose en todos los grupos estudiados.

Con respecto a los pacientes con anemia por deficiencia de hierro, la diferencia con relación al grupo control radica en la disminución de los valores de hepcidina, lo anterior coincide con el estudio de Kemna y cols 2007, donde comparan los valores hepcidina en pacientes con anemia por deficiencia de hierro y un grupo

control, mostrando que existe una diferencia estadísticamente significativa de este analito [36], esto se debe a que los pacientes con anemia ferropénica, muestran una mayor necesidad en la absorción de hierro, por lo cual, los niveles de hepcidina son menores que los vistos en los donantes de sangre [36].

En el actual estudio, se observó que los valores de hepcidina, ferritina y transferrina dependieron exclusivamente de la patología de base. Lo anterior muestra como los valores de hepcidina ayudan a ampliar el perfil de diagnóstico de diferentes entidades en las cuales haya una alteración en el metabolismo del hierro [15], así mismo, en este estudio se evidenció para ambas poblaciones, donantes de sangre y pacientes una correlación directa entre los valores de hepcidina y ferritina puesto que a medida que aumentaban o disminuían los valores de hepcidina, así también lo hacían los valores de ferritina. Hallazgo similar planteó el estudio Galesloot y cols 2011 donde se evaluaron personas consideradas sanas, mostrando que a medida que aumentan los valores de hepcidina aumentan los valores de ferritina [19]. Igualmente el estudio de Sasu y cols 2010 muestra la hepcidina como marcador de anemia inflamatoria, evidenciando que en este tipo de patologías, los valores de ferritina están ligados al aumento de la hepcidina por el componente inflamatorio de las entidades [20,34]. Cabe resaltar que la ferritina presentó una correlación débil con la hepcidina en los pacientes con anemia ferropénica, lo que puede deberse a que en los pacientes con dicha patología, la deficiencia de éste elemento, no sólo está ligada a una inadecuada absorción sino también, a una baja ingesta de hierro, lo que causa que la compensación por parte de la hepcidina no sea suficiente [14].

En conclusión, en el actual estudio se evidencia la importancia de

la determinación de hepcidina para el diagnóstico y diferenciación de las patologías estudiadas y de cómo su implementación puede llevar a generar guías de diagnóstico. Además, cabe resaltar que a pesar de que en este estudio se tenga un bajo número de pacientes en cada grupo, se logran visualizar las diferencias entre los participantes [37,38].

Por lo anterior se propone la determinación de hepcidina, sumada a los análisis que se usan de rutina para la clasificación de entidades como la anemia por deficiencia de hierro o anemia de tipo inflamatorio, lo que podría ayudar al clínico a la toma de decisiones para un mejor diagnóstico y por ende a un adecuado tratamiento [15]. Es así como la hepcidina se propone como un biomarcador para la diferenciación de enfermedades en las cuales se vea alterado el metabolismo del hierro.

Agradecimientos

A los estudiantes de pregrado de Microbiología y Bioanálisis de la Universidad de Antioquia Enderson Murillo Ramos, Luz Onodia Hurtado Florez y Natalia Alejandra Arciniegas que fueron parte en la realización del proyecto. Al personal del banco de sangre Clínica León XIII y a los donantes de sangre por su colaboración. A la IPS Universitaria Sede Clínica León XIII y al Hospital Pablo Tobón Uribe representado por el doctor Kenny Galves por la ayuda para la consecución de los pacientes. Al grupo de GICIG, por permitir el uso de sus instalaciones para la realización de las ELISAs para la determinación de la hepcidina.

Conflictos de interés

En la realización del presente trabajo, ninguno de los autores declara conflicto de interés.

Bibliografía

- 1 García R, Eandi E, Feliú T, Musso A (2010) Conceptos actuales sobre fisiología y patología del hierro. *Hematol* 14: 48-57.
- 2 Barrios Y, Acosta E, Espinoza M, Meléndez A, Méndez D (2007) La homeostasis del hierro y una hormona: la hepcidina. *Salus* 11: 20-25.
- 3 Luukkonen S, Punnonen K (2006) Serum pro-hepcidin concentrations and their responses to oral iron supplementation in healthy subjects manifest considerable inter-individual variation. *Clin Chem Lab Med* 44: 1361-1362.
- 4 Esquivia M, Acevedo T (2012) Hepcidina: su interacción con la hemojuvelina y su aporte en el diagnóstico de la enfermedades relacionadas con el metabolismo del hierro. *Univ Medica* 53: 382-394.
- 5 Rishi G, Wallace D, Subramaniam N (2015) Hepcidin: regulation of the master iron regulator. *Biosci Rep* 35: 1-12.
- 6 Camaschella C (2013) Iron and hepcidin: a story of recycling and balance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* pp: 1-8.
- 7 Forrellat-Barrios M, Fernández-Delgado N, Hernández-Ramírez P (2012) Regulación de la hepcidina y homeostasis del hierro: avances y perspectivas. *Rev Cuba Hematol Inmunol y Hemoter* 28: 347-356.
- 8 Del Castillo R, De Portugal A (2003) Hepcidina, una nueva proteína en la homeostasis del hierro. *An Med Interna* 20: 605-606.
- 9 Benedict T (2015) Liver not making hepcidin? *Hemochromatosis! Blood* 123: 3535-3536.
- 10 Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, et al. (2001) A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 276: 7811-7819.
- 11 Nemeth E, Ganz T (2014) Anemia of Inflammation. *Hematol Oncol Clin North Am* 28: 671-681.
- 12 Nowrousian M (2008) Recombinant Human Erythropoietin (rhEPO) in Clinical Oncology pp: 149-188.
- 13 Concepción M, Cioccia A, Hevia P (2014) Papel de la hepcidina y la ferroportina en la regulación hormonal de la homeostasis del hierro. *Acad biomédica Digit* 59: 1-21.
- 14 Miller J (2013) Iron Deficiency Anemia: A Common and Curable Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3: 1-13.
- 15 Kemna H, Tjalsma H, Willems H, Swinkels D (2009) Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica* 93: 90-97.
- 16 Mantilla C, Pérez R, Cardona J (2014) Hierro corporal en donantes habituales de un banco de sangre de Medellín-Colombia. *Rev Cuba Hematol Inmunol Hemoter* 30: 233-242.
- 17 Kroot J, Kemna E, Bansal S, Busbridge M, Campostrini N, et al. (2009) Results of the first international round robin for the quantification of urinary and plasma hepcidin assays: need for standardization. *Haematologica* 94: 1748-1752.
- 18 Instituto Nacional de Salud (2012) Guía para la selección de donantes de sangre en Colombia.
- 19 Galesloot T, Vermeulen S, Geurts-Moespot A, Klaver S, Kroot J, et al. (2011) Serum hepcidin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood* 117: 218-225.
- 20 Rivera S, Liu L, Nemeth E, Gabayan V, Sorensen O, et al. (2005) Ganz T. Hepcidin excess induces the sequestration of iron and exacerbates tumor-associated anemia. *Blood* 105: 1797-1802.
- 21 Kroot J, Hendriks J, Laarakkers C, Klaver S, Kemna E, et al. (2009) (Pre)analytical imprecision, between-subject variability, and daily variations in serum and urine hepcidin: Implications for clinical studies. *Elsevier Inc* 389: 124-129.
- 22 DRG Diagnostics (2012) Hepcidin 25 bioactive ELISA (EIA-5258).
- 23 Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (2002) Pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos. Geneva
- 24 Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (2002) Pautas Éticas Internacionales para la Investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos de la Organización Mundial de la Salud. Geneva.
- 25 Sardi EP (2005) Cambios sociodemográficos en Colombia: periodo intercensal 1993 - 2005.
- 26 Mantilla C, Cardona J, Pérez R (2012) Caracterización clínica y hematológica de donantes a repetición de un banco de sangre de Medellín-Colombia, 2011. *Med Lab* 18: 459-470.
- 27 Burtis C, Ashwood E, Bruns D (2012). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. (5th edn) Elsevier Health Sciences, London.
- 28 Itkonen O, Parkkinen J, Stenman U, Hämmäläinen E (2012) Preanalytical factors and reference intervals for serum hepcidin LC-MS/MS method. *Elsevier Inc* 413: 696-701.
- 29 Wolff F, Deleers M, Melot C, Gulbis B, Cotton F (2013) Hepcidin-25: Measurement by LC-MS/MS in serum and urine, reference ranges and urinary fractional excretion. *Elsevier Inc* 423: 99-104.
- 30 Grebenchtchikov N, Geurts-Moespot A, Kroot J, den Heijer M, Tjalsma H, et al. (2009) High-sensitive radioimmunoassay for human serum hepcidin. *Br J Haematol* 146: 317-325.
- 31 Murphy A, Witcher D, Luan P, Wroblewski V (2007) Quantitation of hepcidin from human and mouse serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Blood* 110: 1048-1054.
- 32 Department of Clinical Chemistry. Hepcidin analysis, service in mass spectrometry.
- 33 Sedlackova T, Racek J, Rajdl D, Kielberger L, Eiselt J, et al. (2013) Relationship between hepcidin and ferritin in haemodialysed patients. *Springer* 125: 448-452.
- 34 Sasu B, Li H, Rose M, Arvedson T, Doellgast G, et al. (2010) Serum hepcidin but not prohepcidin may be an effective marker for anemia of inflammation (AI). *Elsevier Inc* 45:238-245.
- 35 Tapias M, Idrovo V (2006) Hemocromatosis hereditaria. *Rev Col Gastroenterol* 21: 278-285.
- 36 Kemna E, Tjalsma H, Podust V, Swinkels D (2007) Mass Spectrometry-Based Hepcidin Measurements in Serum and Urine: Analytical Aspects and Clinical Implications. *Clin Chem* 53: 620-628.
- 37 Palaneeswari S, Ganesh M, Karthikeyan T, Manjula A, Mythili S (2013) Hepcidin-Minireview. *J Clin Diagnostic* 7: 1767-1771.
- 38 Means R (2013) Pathophysiology in Medicine: Hepcidin and iron regulation in health and disease. *Am J Med Sci* 345: 57-60.