

**HEPCIDINA SÉRICA EN DONANTES Y EN PACIENTES CON DESORDENES
RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DEL HIERRO, MEDELLÍN, 2015**

Alejandro Gómez Álvarez

Asesora

Maria Isabel Villa Palacio

Escuela de Microbiología

**Proyecto de investigación para optar a título de Magister en Microbiología y
Bioanálisis**

Universidad de Antioquia

Medellín

2016

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 inmunoturbidimetría 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: Hpcidina, 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 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

Introducción

El hierro es un elemento esencial en el metabolismo de los mamíferos debido a su capacidad para aceptar y ceder electrones, lo que le confiere un componente importante de moléculas como el grupo heme de la hemoglobina, la mioglobina y los

citocromos. Procesos como absorción, almacenamiento y distribución de este elemento se deben encontrar en equilibrio, con el fin de mantener las actividades biológicas normales y evitar que se generen efectos nocivos por acumulación o pérdida. Varias moléculas se encuentran involucradas en su regulación, entre ellas la citocromo B duodenal, el transportador de metales divalentes 1 (DMT1), la ferroportina y la hepcidina, esta última desde su descubrimiento en el 2001 se describe como molécula reguladora central de la homeostasis del hierro (1).

La hepcidina, es un polipéptido secretado por el hígado. El gen implicado en su síntesis es HAMP (de las siglas en inglés *hepatic antimicrobial peptide*), se encuentra ubicado en el cromosoma 19 en el locus 19q13.1, codificando un RNAm de 0,4 Kb, conformado por tres exones y dos intrones, los que al ser procesados en el retículo endoplásmico dan lugar a una proteína de 84 aminoácidos denominada prohepcidina (2). Ésta proteína sufre varios cambios en su conformación, en primera instancia, gracias a la encisión en su cadena polipeptídica se genera una proteína de 64 aminoácidos, luego, en segunda instancia se genera una proteína de 39 aminoácidos, que por acción de una furina, da lugar a la isoforma 25 forma activa del péptido (2,3). La estructura de la isoforma 25 es una horquilla sencilla con 8 cisteínas unidas por 4 puentes disulfuro, presentando los dominios N-terminal y C-terminal, los cuales le dan la capacidad de interactuar con la ferroportina, proteína encargada de la exportación del hierro de la célula (2,4). Además de la isoforma 25, existen las isoformas 20 y 22 resultado de su degradación, que se encuentran igualmente en orina, pero no tienen un papel representativo en el metabolismo del hierro.(1,2,3).

La principal de la función de la hepcidina es bloquear la ferroportina, fosforilándola, lo que conlleva a su internalización, dificultando la exportación del hierro de la célula. Lo anterior lo realiza la hepcidina por medio del reconocimiento de los niveles de hierro en el organismo, a través de la proteína morfogénica ósea. Es por lo anterior que cuando el hierro está en altas concentraciones, se libera la hepcidina con el fin de fosforilar y degradar la ferroportina (3,4,5). 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 (1,2,8). Otra de las funciones de la hepcidina es regular la

absorción del hierro a través del intestino delgado, por medio de la citocromo B duodenal y el transportador de metales divalentes 1 (1).

La producción de hepcidina es regulada por algunas vías que promueven o inhiben la síntesis del gen HAMP (1,10), entre las que se encuentran la vía de la proteína BMP (proteína morfogénica ósea), dicha proteína pertenece a la superfamilia de las citoquinas denominada factor transformante de crecimiento β (TGF- β) y a la fecha es uno de los mecanismos moleculares más estudiados (10,11). La función de la BMP es aumentar la síntesis del gen HAMP cuando los niveles de hierro sérico están aumentados (1,10,11). 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 lipopolisacárido (10,12). Por su parte, la inhibición de la producción de hepcidina está mediada principalmente por la eritropoyesis, es decir, cuando hay demanda de producción de eritrocitos, como en los estados de anemia o de hipoxia, se genera un estímulo para la producción de eritropoyetina, a lo cual se suma una disminución en la saturación de transferrina (8), llevando a un bloqueo en la producción de hepcidina y un aumento en los niveles séricos de hierro, generando así eritropoyesis efectiva. Adicionalmente se ha planteado que durante la eritropoyesis, el eritroblasto en su proceso de maduración produce factor de diferenciación de crecimiento 15 (GDF15), el cual tiene un efecto inhibitorio frente a la producción de hepcidina (10,11).

Por lo anterior, cuando existe una alteración en el metabolismo del hierro, los niveles de hepcidina varían de acuerdo a patologías específicas (4), como en la anemia inflamatoria o anemia de enfermedades crónicas (13). En dichas enfermedades se da un aumento en la producción de moléculas proinflamatorias, principalmente la IL-6, que actúan sobre la síntesis del gen HAMP a nivel hepático, generando un aumento de la hepcidina en sangre, lo que conlleva a una disminución en la absorción del hierro duodenal y ocasionan una inadecuada exportación por degradación de la ferroportina (7,14). Como consecuencia, en estos pacientes los niveles de ferritina pueden estar normales o aumentados (7,15).

Por su parte en la hemocromatosis hereditaria tipo 1, se presenta una disminución de la hepcidina debido a la mutación en el gen HFE (de su sigla en inglés High Iron Fe), que genera un aumento en la absorción del hierro, produciendo acumulación de éste elemento en las células parenquimatosas. En la hemocromatosis, debido a una inadecuada regulación de la producción de hepcidina por la vía BMP causada por la mutación del gen HFE, se genera una disminución de la síntesis de hepcidina, lo que conlleva a una sobreexpresión de la ferroportina, generando un aumento de los niveles de hierro séricos en estos pacientes (7,16,17). Por el contrario, en la anemia ferropénica, se presentan niveles disminuidos de hierro, los cuales se pueden deber a: pérdida sanguínea sin compensación, ingesta inadecuada o problemas en la absorción del hierro. En estos pacientes, la disminución de este elemento conlleva a una alteración en la eritropoyesis, ya que el hierro juega un papel fundamental en la síntesis del grupo heme de la hemoglobina. Debido a lo anterior, en estos pacientes los niveles de hepcidina se encuentran disminuidos con el fin de compensar la ausencia del hierro permitiendo la absorción y biodisponibilidad (18).

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 (5,19). 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 (5). Entre ellas se encuentran: El SELDI-TOF (de su sigla en inglés *Surface-enhanced laser desorption/ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry*), técnica que permite la determinación de proteínas por medio de la espectrometría de masas y un láser de desorción, lo anterior le otorga la capacidad de diferenciar la hepcidina en las isoformas 20, 22 o 25. Posee una sensibilidad de analítica del kit es $<0,9765$ nM/L y especificidad del 99%, es una prueba rápida y fiable, sin embargo su implementación es difícil debido a su costo y a la necesidad de laboratorios especializados de alto nivel. Así mismo, se han estandarizado técnicas enzimáticas como la ELISA o Radioinmunoensayo, las cuales se implementan como alternativa a las técnicas moleculares, diseñadas para determinar la isoforma 25 de la proteína y presentan una adecuada correlación con los hallazgos en las técnicas moleculares (20–22). Entre las ventajas de la utilización de las técnicas enzimáticas se encuentran: el bajo costo y que no requieren

laboratorios especializados; además según el Departamento de Química Clínica de Holanda, es la técnica más apropiada para medir Hecpidina en grandes cantidades de muestras (20).

Luego de la revisión de artículos de investigación originales publicados en Pubmed, Lilacs, Scielo, Wiley, e-Blood, Elsevier y ScienceDirect 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. Por lo anterior se plantea la necesidad de evaluar la hepcidina en nuestra población, con el fin de implementarla en el esquema de diagnóstico de pacientes con alteraciones en el metabolismo del hierro.

Como objetivo del presente estudio se propone determinar la concentración de hepcidina en donantes de sangre y pacientes con desórdenes relacionados con el metabolismo del hierro, evaluando los diferentes analitos que se usan de rutina, además, de su interacción con la hepcidina.

Metodología

Tipo de estudio:

Estudio descriptivo transversal

Población de estudio

Donantes de sangre: se recolectaron 85 donantes de sangre adultos mayores de 18 años que asistieron al Banco de Sangre de la Escuela de Microbiología en el año 2014 y cumplieron con los criterios de inclusión definidos en el actual estudio, este grupo se definió como grupo control. El cálculo del tamaño de la muestra se estimó por conveniencia y el muestreo se realizó de forma aleatoria con el fin de alcanzar un número similar de hombres y mujeres. Como criterios de inclusión se definieron:

cumplir con los requisitos establecidos por la Guía para la selección y atención de donantes de sangre en Colombia (23) para ser aceptados como donantes de sangre, además la firma del consentimiento informado para participar en el estudio. Como criterio de exclusión se definió la alteración de alguno de los parámetros de laboratorio relacionados con la evaluación del metabolismo del hierro (hierro total, ferritina, hemoglobina y transferrina). Todo esto se realizó de acuerdo a la Tabla 1.

Pacientes: se recolectaron un total de 74 pacientes, hospitalizados y de consulta externa, al igual que en los donantes de sangre el muestreo se realizó por conveniencia, sin tener en cuenta la proporción del género, además, debían tener entre 18 y 65 años con el fin de extrapolarlo a la población de donantes de sangre. Como criterios de inclusión se definieron: pacientes que tuvieran diagnóstico de patologías relacionadas con la alteración del metabolismo del hierro, entre las principales se encuentran anemia ferropénica, anemia por enfermedades crónicas y hemocromatosis; además que no estuvieran recibiendo actualmente tratamiento de suplemento de hierro (22,24). El diagnóstico se definió por revisión de la historia clínica de los participantes. Así mismo aceptar participar en el estudio mediante la firma del consentimiento informado. Como criterio de exclusión se definió: pacientes con parámetros de laboratorio que dependiendo de la patología esté entre los valores normales.

La población de pacientes fue clasificada por grupos de acuerdo a la enfermedad que presentaban y se determinaron los analitos establecidos para el estudio, lo anterior con el fin de realizar una comparación en el comportamiento entre estos y el grupo control.

Toma de muestra

Las muestras para ambas poblaciones se recolectaron en dos tubos secos (10 mL) y un tubo con anticoagulante EDTA (4 mL) a partir de venopunción usando sangre venosa; para los donantes de sangre se obtuvo a partir de la bolsa satélite que poseen los sistemas de recolección de sangre. 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* (22,25). Las muestras para los exámenes de hemograma, ferritina, sideremia y transferrina se procesaron entre las primeras 4 horas luego de la recolección. Las muestras para

hepcidina se congelaron a -20°C hasta ajustar el número para del montaje de los platos de ELISA.

DETERMINACIONES DE LABORATORIO

A todos los participantes del estudio se les realizó determinación de hepcidina, hemoglobina, ferritina, hierro total y transferrina.

Determinación de la hepcidina sérica

Se realizó mediante el Kit DRG Heparin-25 (bioactive)[®], inmunoensayo enzimático utilizado para la determinación cuantitativa de la isoforma 25 de la hepcidina en suero y plasma, este kit sólo sugiere su utilidad para fines investigativos y el registro INVIMA se expide sólo con este fin. La linealidad del método es hasta 390,6 nM/L, no presenta reactividad cruzada con otras moléculas como Pro-hepcidina, Alfafetoproteína (AFP), Gonadotropina coriónica humana (HCG), Lactógeno placentario humano (HPL) y Hormona Estimuladora del Folículo (FSH), no se conocen medicamentos que alteren la medición de ésta proteína, la sensibilidad analítica del kit es $<0,9765$ nM/L (26). Los reactivos se trataron de acuerdo a las indicaciones del inserto, con la reconstitución adecuada (26). La lectura se realizó a 460 nm, con corrección de interferencia a 620 nm. Además se calcula la gráfica de 4 PL (Parameter Logistic), debido a que es la curva más indicada para el cálculo de la concentración de los estándares, y así hallar la concentración de las muestras (27)

Hemograma completo

A cada participante se le realizó un hemograma automatizado en el equipo **Advia 2120I Siemens[®]**, el cual utiliza los principios de citometría de flujo y enfoque hidrodinámico para el conteo de células, y colorimetría para la determinación de hemoglobina; además, se utilizaron controles de calidad interno y externo (Randox International Quality Assessment Scheme - RIQAS) para garantizar la calidad de los resultados.

Determinación de la ferritina

Se realizó mediante test inmunológico in vitro para la determinación cuantitativa de la ferritina en suero. Utilizando quimioluminiscencia. Procesadas en el equipo **Advia centauro XP Siemens[®]**.

Determinación de la transferrina

Se determinó mediante prueba de inmunoturbidimetría para la determinación cuantitativa in vitro de transferrina en suero humano en el equipo **Dimension RXL Max Siemens®**.

Determinación de hierro total

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

Consideraciones éticas y descripción de riesgos potenciales

El estudio se llevó a cabo siguiendo la normativa Colombiana vigente que regula la investigación clínica en humanos, dicha investigación fue clasificada como de riesgo mínimo debido a que no genera ningún tipo de incapacidad en los participantes; durante el estudio no se incurrió en ningún riesgo psicológico, legal, social, entre otros (Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia). El estudio fue aprobado mediante acta 13-08-477 evaluado por el comité de ética de la Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia. Además la investigación se siguió bajo las normas deontológicas reconocidas por la declaración de Helsinki para la investigación clínica en humanos (28,29).

Plan de análisis

Para las variables cualitativas se utilizaron distribuciones de frecuencia absoluta, como el porcentaje. Para el análisis de las variables cuantitativas se calculó la media aritmética y mediana como medidas de tendencia central y la desviación estándar o rango intercuartil como medidas de dispersión respectivamente. Las diferencias entre los diferentes analitos se analizaron usando las pruebas de “diferencia mínima significativa (DSM) en comparaciones múltiples” para las variables que tuvieron una distribución normal y “Comparaciones múltiples con corrección de Bonferroni” para las variables que tuvieron una distribución no normal. Para los valores de hepcidina se usaron intervalos de confianza al 95% usando como medida de tendencia central la mediana. Las correlaciones entre la hepcidina y los otros analitos medidos en el estudio se calcularon usando el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman

dependiendo de la normalidad de los datos. 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 y en los donantes de sangre. Por último para el ajuste de variables confusoras se usó un modelo de regresión. Estos análisis se realizaron con el software estadístico SPSS statistics versión 21®.

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	

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: 16g/dL y 13,8g/dL; ferritina: 167,5ng/mL y 41,2ng/mL; hierro total: 98µg/dL y 81µg/dL; transferrina: 244mg/dL y 274mg/dL.

Según los resultados anteriores, se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre el género y la concentración de hemoglobina ($p= 0.001$) 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 2005 (30): 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 1.

Tabla 1. 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

Correlación de la hepcidina sérica con los diferentes parámetros de laboratorio utilizados en la valoración del metabolismo del hierro

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, 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 2).

Tabla 2. Comparaciones entre los valores de hepcidina: pacientes versus donantes de sangre

	Grupo					
	Insuficiencia renal crónica	Tumores sólidos	Anemia ferropénica	Hemocromatosis	Donantes de sangre	
	Me	Me	Me	Me	Me	Valor p
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)

Correlación bioquímica entre la hepcidina y los diferentes analitos en pacientes, según grupo de enfermedad

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 3, según el modelo de regresión, las diferencias entre los niveles de hepcidina, ferritina y transferrina de cada grupo de pacientes se deben exclusivamente a la enfermedad.

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. (11). (Tabla 4).

Tabla 3. Modelo de regresión para el ajuste de las variables confusoras

A

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Valor de p
	B		
1	(Constante)	1193,987	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	0,051
	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 4. Comparaciones entre los diferentes analitos analizados en pacientes

	Diagnóstico								
	Insuficiencia renal crónica		Tumores sólidos		Anemia ferropénica		Hemocromatosis		
	Media	Me	Media	Me	Media	Me	Media	Me	Valor p
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

Discusión

Este estudio presenta los resultados de la primera investigación en Colombia en la literatura biomédica disponible sobre la determinación de hepcidina en donantes de sangre y en pacientes diagnosticados con alteraciones en el metabolismo del hierro. Para lograrlo se planteó la determinación de hemoglobina, ferritina, hierro total y transferrina, pruebas que se realizan de rutina para el diagnóstico de los estados de anemia, ya sea de tipo inflamatorio o anemias carenciales como la deficiencia de hierro, en segunda instancia se determinó la concentración de la hepcidina proteína encargada de regular el metabolismo del hierro; lo anterior permitió realizar una comparación entre la hepcidina y la ferritina, hierro total y la transferrina y así evaluar la interacción entre ellos, agregando valor al diagnóstico de estas patologías.

Se observó que en el grupo de donantes de sangre, no se presentó ninguna alteración en los valores de la hemoglobina, según la legislación Colombiana (23). Los demás exámenes se realizaron con el fin de ser comparados con nuestra población de pacientes y así evaluar cuál era la diferencia con las distintas poblaciones. Los resultados de hemoglobina y ferritina se encontraban en el Índice biológico de referencia (IBR) y concordaron con los encontrados en los estudios de *Mantilla y cols* 2011 y 2014 (19,31) donde también determinaron el perfil hematológico y las reservas de hierro en una población de donantes de sangre repetitivos. En estos estudio también evidenciaron que los valores de hemoglobina de los donantes estaban en el rango exigido por la norma (23). Cabe aclarar que los valores de ferritina de nuestros donantes estuvieron por encima de la mediana que indica el estudio antes mencionado, debido a que nuestros donantes de sangre no eran donantes repetitivos. El hierro total y transferrina, corresponden con los valores reportados por *Burtis y cols* 2012, en el cual dan los valores de variabilidad biológica en la población normal de estos analitos (32).

La concentración de hepcidina, hemoglobina y ferritina en el grupo de donantes de sangre presentó variaciones estadísticamente significativas con relación al género, ya que los hombres presentaron valores superiores para estos analitos 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, (21,33,34) los cuales reportan al igual que nuestro estudio, niveles superiores en el género masculino, lo cual puede deberse a que las mujeres durante el ciclo menstrual presentan una pérdida de sangre fisiológica, que produce una disminución en los niveles de hierro con respecto a los hombres; como efecto de esto los requerimientos en su absorción son más altos, provocando que la hepcidina disminuya, lo que genera un estímulo en las moléculas del transportador de metales divalentes 1 y la citocromo B duodenal, que permiten un aumento en la absorción del hierro, además permite que la ferroportina exporte este elemento de manera adecuada (2). Los valores de hepcidina en la población (tabla 2) fueron similares a los encontrados en otros estudios como el de *Wolff y cols* 2013 e *Itkonen y cols* 2012 donde muestran que los valores de hepcidina para una población normal, están entre 2,1 - 15,1 nM en hombres y 1.6–15.6nM en mujeres según el estudio de *Wolff y cols* y según el estudio de *Itkonen y cols*, en hombres el valor está entre 1,1-15,6nM y en mujeres entre 0,7-16,8nM (33,34). Cabe resaltar que en estos estudios la técnica empleada para la determinación de la concentración de hepcidina fue cromatografía líquida con espectrometría de masas. (34,35) En el actual estudio se usó la ELISA competitiva, debido a que es una técnica que posee una adecuada correlación con las técnicas moleculares, además, es de fácil estandarización e implementación. Asimismo, es una técnica idónea a la hora de procesar grandes cantidades de muestras (20)..

Con relación a las variaciones observadas según la etapa reproductiva en los artículos de *Itkonen y cols* 2012 y *Galesloot y cols* 2011 (22,33), el grupo de las mujeres es separado por su etapa hormonal, mostrando que las mujeres que están en la etapa de menopausia, presentan valores de hepcidina similares a los de los hombres. En el presente estudio no se tuvo en cuenta el estado hormonal de las mujeres, por lo cual los resultados no tienen correspondencia con los estudios enunciados; (23). Además el promedio de edad en las mujeres en nuestro estudio fue de 33 años \pm 13, lo cual pone a nuestra población en mujeres en edad reproductiva. Por lo anterior, se sugiere un estudio posterior en el cual se

determine la concentración de hepcidina y se tenga en cuenta la edad y la etapa hormonal en la que se encuentren los participantes, esto con el fin de establecer un IBR para la hepcidina, en el cual se tenga en cuenta el grupo etario.

Los valores de hepcidina, ferritina, hierro total y transferrina presentaron diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de los diagnósticos, ya que de acuerdo a la fisiopatología de la entidad el comportamiento de los analitos será diferente; es el caso de enfermedades como la anemia por deficiencia de hierro, en la cual, la absorción del hierro se encuentra alterada ya sea por, inadecuada ingesta de este elemento o una pérdida de sangre aguda o crónica debido a los períodos menstruales o una hemorragia de tracto gastrointestinal, lo que genera una disminución en la concentración de hepcidina, así mismo una disminución en la concentración de ferritina (18). Por su parte en la anemia, de tipo inflamatorio, se produce una inadecuada absorción del hierro, debido al aumento en los niveles de las moléculas proinflamatorias que estimulan la producción de la hepcidina por estimulación en la síntesis del gen HAMP, generando un aumento en los niveles de ferritina, debido a la acción que ejerce la hepcidina sobre la ferroportina. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por *Miller* 2014, el cual en su artículo de revisión “Iron Deficiency Anemia: A Common and Curable Disease”, habla sobre cómo al evaluar diferentes analitos, entre ellos la hepcidina, se puede llegar a un adecuado diagnóstico en enfermedades en las cuales esté alterado el metabolismo del hierro, además *Nemeth y cols* 2014 en su revisión titulada “Anemia of Inflammation”, describen la fisiopatología de las anemias de tipo inflamatorio y de cómo mediante la interpretación de los diferentes analitos como la hepcidina, se puede llegar a un diagnóstico diferencial en enfermedades donde se altere la absorción y disponibilidad del hierro (13,18). Con relación a los valores de transferrina, en la anemia de tipo inflamatorio se encuentran disminuidos, lo anterior se produce posiblemente, por la compensación que se da por parte del sistema encargado de sintetizar la transferrina, el sistema retículo endotelial, el cual al reconocer los niveles séricos de hierro disminuidos por el estado inflamatorio del paciente, genera una disminución en la concentración de la transferrina (13). En este tipo de pacientes el desarrollo de la

anemia se da por el aumento de moléculas proinflamatorias, las cuales interactúan con la vía JAK en el hepatocito para la síntesis del gen HAMP (10,12,16). Adicionalmente en la insuficiencia renal, existe una disminución en la producción de eritropoyetina, además, una pérdida de eritrocitos inducida por el proceso de diálisis, lo que se suma a un aumento de los estados de inflamación debido a paso de la sangre por las membranas de diálisis(36). Sin embargo existen autores como *Sedlackova y cols* 2013, que proponen como parte del tratamiento para la insuficiencia renal, el uso de filtros de diálisis para filtrar la hepcidina y así disminuir la concentración de esta proteína (36).

La anemia por deficiencia de hierro, se produce principalmente por la disminución de los niveles de hierro debidos a una mala absorción, un bajo consumo y/o perdidas del elemento principalmente en los períodos menstruales (18). En el presente estudio para esta enfermedad se evidenció una disminución significativa en los niveles de ferritina, posiblemente debida a una inadecuada absorción o a una pérdida de hierro, lo que lleva a que todo el hierro que se capte sea utilizado y no sea almacenado en forma de ferritina, lo cual se evidenció en los niveles de ferritina que tuvo este grupo de pacientes en el estudio. Por su parte los valores de hepcidina en este grupo de pacientes están disminuidos, lo cual se genera como estímulo para la absorción del hierro por parte del duodeno (10). En contraste, este grupo de pacientes presentaron niveles de transferrina aumentados, con el fin de captar el hierro que es exportado de la célula y llevarlo a médula ósea para generar la eritropoyesis, estos hallazgos concuerdan con lo que expone también *Miller* 2013, donde muestran como la dieta, la pérdida de sangre o una inadecuada captación del hierro, lleva a que se genere un sistema de compensación en el organismo para la absorción de este elemento (18).

Por lo tanto, será de gran utilidad que se realicen nuevos estudios donde se tenga en cuenta también la medición de marcadores de inflamación, los cuales no se tuvieron en cuenta en el actual, debido a que en nuestro estudio sólo se tuvieron en cuenta las variables que se usan de rutina para evaluar el metabolismo del hierro. Lo anterior se propone con el fin de implementar protocolos como los que

plantean *Barbra y cols* 2010, los cuales proponen que cuando un paciente tiene la Proteína C reactiva (PCR) baja y unos niveles de hepcidina bajos, estamos ante un paciente con una posible anemia por deficiencia de hierro; en cambio si la PCR está aumentada y la hepcidina aumentada, es una posible anemia de tipo inflamatorio; pero si la PCR está disminuida y la hepcidina aumentada, el paciente puede estar padeciendo de una anemia de tipo mixto (37).

En contraste con los estados de anemia, están los pacientes con hemocromatosis, los cuales presentaron valores de hepcidina disminuidos con respecto a los donantes sanos y a los pacientes con anemia de tipo inflamatorio (tabla 6); lo anterior, se debe a que mutación del gen HFE, imposibilita que se lleve a cabo el *feedback* para aumentar la producción de hepcidina y así impedir la absorción de hierro (38), dando como resultado un aumento descontrolado del hierro, lo que produce un aumento en los niveles de hierro total y hemoglobina, comparados a todos los grupos del estudio (tabla 6).

Por otro lado, al comparar los valores de hepcidina y de los demás analitos entre los pacientes y el grupo de donantes (grupo control), mostraron que hubo diferencias estadísticamente significativas en ambas poblaciones. En primer lugar en los pacientes con insuficiencia renal, se encontró un aumento en los niveles de hepcidina, ferritina y una disminución en los valores de hemoglobina y transferrina, con respecto al grupo de donantes de sangre; los hallazgos concuerdan con los obtenidos por *Sedlackova y cols* 2013, donde evalúan un grupo control con un grupo de pacientes con insuficiencia renal, los cuales al igual que en nuestro estudio, tenían valores de ferritina y hepcidina mayores que los del grupo control, y unos valores de hemoglobina y transferrina disminuidos (36); la misma situación se presenta en los pacientes con tumores sólidos, los cuales también se incluyen en el grupo de pacientes con anemia inflamatoria. Con respecto a los pacientes con anemia por deficiencia de hierro, la diferencia con relación al grupo control radica en una disminución de los valores de hepcidina, ferritina y hemoglobina y un aumento, por compensación, de los valores de transferrina, lo cual coincide con el estudio de *Kemna y cols* 2007, donde comparan los valores de ferritina,

hemoglobina, y hepcidina en pacientes con anemia por deficiencia de hierro y un grupo control, mostrando que existe una diferencia estadísticamente significativa entre estos analitos en las personas con anemia por deficiencia de hierro y las personas sanas (39). Ahora bien, en los pacientes con hemocromatosis los niveles de ferritina, hemoglobina son más altos que en nuestro grupo control, además los valores de hepcidina están disminuidos, debido a la alteración en la absorción del hierro, lo que concuerda con lo propuesto en su estudio por *Kemna y cols 2007* (39).

Los valores de hepcidina, ferritina y transferrina en el actual estudio dependen exclusivamente de la patología de base (tabla 8), lo que demuestra que la hepcidina es un analito que amplía el perfil de diagnóstico de diferentes entidades en las cuales haya una alteración en el metabolismo del hierro (5), así mismo, en este estudio ambas poblaciones, donantes de sangre y pacientes, se evidenció una correlación positiva entre la ferritina y la concentración de hepcidina, es decir, a medida que aumentan o disminuyen los valores de hepcidina, así también lo hacen los valores de ferritina. Hallazgo similar planteó *Galesloot y cols 2011* en el cual evaluaron personas consideradas sanas, mostrando que a medida que aumentan los valores de hepcidina aumentan los valores de ferritina (22). Igualmente el estudio de *Sasu y cols 2010* evalúa 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 estas entidades (37). Lo anterior demuestra la estrecha relación que tiene la ferritina al estar ligada a la concentración de la hepcidina en sangre (24).

Todo lo expuesto evidencia la importancia de la determinación de hepcidina para el diagnóstico y diferenciación de distintas patologías y de cómo su implementación puede llevar a generar guías de diagnóstico y blancos terapéuticos para pacientes con anemia de tipo inflamatorio. Además, cabe resaltar que a pesar de que en el actual estudio se tenga un bajo número de pacientes en cada grupo, se logran visualizar las diferencias entre los diferentes participantes (4,40).

En conclusión, la medición hepcidina se propone como una prueba de gran utilidad para realizar diagnósticos diferenciales entre entidades que presenten alteraciones en el metabolismo del hierro, como la anemia por deficiencia de hierro, y anemias de tipo inflamatorio (5). Igualmente el presente trabajo sugiere la realización de nuevos estudios que comprendan aquellas variables que no fueron medidas, entre ellas la concentración de citoquinas proinflamatorias, y otras variables como la saturación de transferrina, con el fin de ampliar perfiles de diagnóstico.

Bibliografía

1. García, Rosolen N, Eandi, Eberle S, Feliú, Torres A, Musso A. Conceptos actuales sobre fisiología y patología del hierro. *Hematol.* 2010;14(2):48–57.
2. Esquivia M, Maria Claudia, Acevedo T PA. Hecpidina: su interacción con la hemojuvelina y su aporte en el diagnóstico de la enfermedades relacionadas con el metabolismo del hierro. *Univ Medica.* 2012;53(4):382–94.
3. Singh B, Sakira A, Poonam A GS. Hecpidin: A novel peptide hormone regulating iron metabolism. *Clin Chim Acta.* 2011;412(11-12):823–30.
4. Palaneeswari, Subha, Ganesh, M, Karthikeyan, T, Manjula, A.J, Mythili S. Hecpidin-Minireview. *J Clin Diagnostic.* 2013;7(8):1767–71.
5. Kemna, Erwin H. J. M , Tjalsma, Harold, Willems, Hans L, Swinkels DW. Hecpidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica.* 2008;93(1):90–7.
6. Konz, Tobias, Alonso-García, Javier, Montes-Bayón, María, Sanz-Medel A. Comparison of copper labeling followed by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and immunochemical assays for serum hepcidin-25 determination. *Elsevier Inc.* 2013;799:1–7.
7. Del Castillo R, A, De Portugal A J. Hecpidina, una nueva proteína en la homeostasis del hierro. *An Med Interna.* 2003;20(12):605–6.
8. Barrios, Yubire, Acosta, Edgar, Espinoza, Milagros, Meléndez, Andreína, Méndez D. La homeostasis del hierro y una hormona: la hepcidina. *Salus.* 2007;11(3):20–5.
9. Luukkonen, S, Punnonen K. Serum pro-hepcidin concentrations and their responses to oral iron supplementation in healthy subjects manifest considerable inter-individual variation. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(11):1361–2.

10. Rishi, Gautam , Wallace, Daniel, Subramaniam N. Heparin: regulation of the master iron regulator. *Biosci Rep.* 2015;35:1–12.
11. Camaschella C. Iron and hepcidin: a story of recycling and balance. *Hematology.* 2013;1–8.
12. Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B. B, P. and Loreal O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem.* 2001;276:7811–9.
13. Nemeth, Elizabeta, Ganz T. Anemia of Inflammation. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2014;28(4):671–81.
14. Nowrousian M. Recombinant Human Erythropoietin (rhEPO) in Clinical Oncology. Second. Springer, editor. 2008. 149 - 188 p.
15. Concepción Páez, M, Cioccia, A, Hevia P. Papel de la hepcidina y la ferroportina en la regulación hormonal de la homeostasis del hierro. *Acad biomédica Digit.* 2014;59:1–21.
16. Forrellat-Barrios, Mariela, Fernández-Delgado, Norma, Hernández-Ramírez P. Regulación de la hepcidina y homeostasis del hierro: avances y perspectivas. *Rev Cuba Hematol Inmunol y Hemoter.* 2012;28(4).
17. Benedict T. Liver not making hepcidin? Hemochromatosis! *Blood.* 2015;123(23):3535–6.
18. Miller JL. Iron Deficiency Anemia: A Common and Curable Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3:1–13.
19. Mantilla, Carmen, Pérez, Rocío, Cardona J. Hierro corporal en donantes habituales de un banco de sangre de Medellín-Colombia. *Rev Cuba Hematol Inmunol Hemoter.* 2014;30(3):233–42.
20. Department of Clinical Chemistry. Heparin analysis, service in mass spectrometry [Internet]. 2015 [cited 2015 Oct 9]. p. 1–2. Available from: <http://www.hepcidinanalysis.com>
21. Grebenchtchikov, Nicolai , Geurts-Moespot, Anneke J, Kroot, Joyce J. C, den Heijer, Martin , Tjalsma, Harold, Swinkels, Dorine W, Sweep FG. High-sensitive radioimmunoassay for human serum hepcidin. *Br J Haematol.* 2009;146:317–25.
22. Galesloot, Tessel E, Vermeulen, Sita H, Geurts-Moespot, Anneke J, Klaver, Siem M, Kroot, Joyce J, van Tienoven, Dorlene, Wetzels, Jack F. M, Kiemeney, Lambertus A. L. M, Sweep, Fred C, den Heijer, Martin and Swinkels DW. Serum hepcidin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood.* 2011;117:218–25.
23. Instituto Nacional de Salud. Guía para la selección de donantes de sangre en Colombia [Internet]. 2012 [cited 2015 Nov 12]. p. 1–71. Available from: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional->

Laboratorios/Publicacio/Gu%C3%ADa para Selecci%C3%B3n de Donantes de Sangre en Colombia 2013.pdf

24. Rivera, S., Liu, L., Nemeth, E., Gabayan, V., Sorensen, O. E., Ganz T. Heparin excess induces the sequestration of iron and exacerbates tumor-associated anemia. *Blood*. 2005;105(4):1797–802.
25. Kroot, Joyce J. C, Hendriks, Jan C.M, Laarakkers, Coby M.M, Klaver, Siem M, Kemna, Erwin H. J. M, Tjalsma, Harold , Swinkels DW. (Pre)analytical imprecision, between-subject variability, and daily variations in serum and urine hepcidin: Implications for clinical studies. Elsevier Inc. 2009;389:124–9.
26. DRG Diagnostics. Heparin 25 bioactive ELISA (EIA-5258), Instructions for Use [Internet]. 2012 [cited 2014 Aug 1]. Available from: <http://www.drg-diagnostics.de/118-1-DRG+Heparin+ELISA.html>
27. Elisaanalysis. 4PL ELISA curve, 4 parameter logistic curve fitting [Internet]. 2014 [cited 2015 Nov 20]. p. 1. Available from: <http://elisaanalysis.com/knowledge-base/elisa-software-4-parameter-logistic-4pl-nonlinear-regression/>
28. Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud. Pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos [Internet]. 2002 [cited 2015 Jul 7]. Available from: http://www.ub.edu/rceue/archivos/ Pautas_Eticas_Internac.pdf
29. Organización Mundial de la Salud. Pautas Éticas Internacionales para la Investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos de la Organización Mundial de la Salud [Internet]. 2002 [cited 2015 Jul 7]. Available from: <http://www.recerca.uab.es/ceeah/docs/ Resum CIOMS.pdf>
30. DANE. Cambios sociodemográficos en Colombia: periodo intercensal 1993 – 2005 [Internet]. 2005 [cited 2015 Jul 7]. Available from: https://www.dane.gov.co/revista_ib/html_r4/articulo2_r4.htm
31. Mantilla, Carmen Yulieth, cardona, Jaiberth Antonio, Pérez R. Caracterización clínica y hematológica de donantes a repetición de un banco de sangre de Medellín-Colombia, 2011. *Med Lab*. 2012;18(9):459-470.
32. Burtis, Carl A, Ashwood, Edward R, Bruns, David E. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 5th ed. London: Elsevier Health Sciences; 2012.
33. Itkonen, Outi, Parkkinen, Jaakko, Stenman, Ulf-Håkan, Hämäläinen E. Preanalytical factors and reference intervals for serum hepcidin LC–MS/MS method. Elsevier Inc. 2012;413:696–701.
34. Wolff, Fleur, Deleers, Marie , Melot, Christian , Gulbis, Béatrice , Cotton F. Heparin-25: Measurement by LC–MS/MS in serum and urine, reference ranges and urinary fractional excretion. Elsevier Inc. 2013;423:99–104.
35. Murphy, Anthony T., Witcher, Derrick R., Luan, Peng, Wroblewski VJ.

Quantitation of hepcidin from human and mouse serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Blood*. 2007;110:1048–54.

36. Sedlackova, Terezie, Racek, Jaroslav, Rajdl, Daniel, Kielberger, Lukas, Eiselt J, Malanova, Lada, Babuska V. Relationship between hepcidin and ferritin in haemodialysed patients. *Springer*. 2013;125:448–52.
37. Sasu, Barbra J, Li, Hongyan, Rose, Mark J, Arvedson, Tara L, Doellgast, George, Molineux G. Serum hepcidin but not prohepcidin may be an effective marker for anemia of inflammation (AI). *Elsevier Inc*. 2010;45:238–45.
38. Tapias, Mónica , Idrovo V. Hemocromatosis hereditaria. *Rev Col Gastroenterol*. 2006;21(4).
39. Kemna, Erwin H.J.M., Tjalsma, Harold, Podust, Vladimir N., Swinkels DW. Mass Spectrometry–Based Hepcidin Measurements in Serum and Urine: Analytical Aspects and Clinical Implications. *Clin Chem*. 2007;53(4):620–8.
40. Means R. Pathophysiology in Medicine: Hepcidin and iron regulation in health and disease. *Am J Med Sci*. 2013;345(1):57–60.