

## **La hepcidina como marcador de diagnóstico diferencial de anemias asociadas al metabolismo del hierro**

Brito-Perea MC, Medina-Camacho JA, Moreno-Lozano P, Landeros-Sánchez B, Hurtado- Ayala  
La Universidad Autónoma de Baja California, Tijuana, B.C. México.  
E mail: mcmbp12@hotmail.com

### **RESUMEN**

La hepcidina es un factor de regulación central de la absorción intestinal de hierro y de su tránsito en la membrana del macrófago y sus niveles se asocian con alteraciones del metabolismo del hierro. El objetivo es cuantificar niveles de hepcidina en universitarias con anemias asociadas al metabolismo del hierro mediante técnica de inmunoensayo (ELISA), como marcador de diagnóstico diferencial, se realizó citometría hemática completa a 127 estudiantes universitarias femeninas entre 18 y 26 años (ADVIA 60 de Bayer), hierro sérico (POINTE), capacidad total de fijación de la transferrina (CTFT) y transferrina (SPINREACT) mediante turbidimetría cuantificada (espectrofotómetro DR 5000 UV-Vis de Hach), ferritina (Accu-Bind) por inmunoensayo, lector de microplacas EliRead RT-2100C Kontrolaby niveles de Hpcidina por inmunoensayo (DGR 25-HS), por duplicado (Coeficiente de Correlación Intraclase CCI=0.991), pruebas de significancia estadística: razón de probabilidades y la prueba  $\chi^2$  (chi-cuadrado) de Pearson, con Software SPSS versión 22. Se confirmó anemia ferropénica (AF) (82,8 %), sideroblástica (AS) (17,2 %) y (3,4 %) asociada a padecimientos crónicos (APC). Los niveles de Hpcidina mostraron diferencia entre la población con y sin diagnóstico de anemia hipocrómica con una correlación significativa entre los niveles de hepcidina y ferritina para las AF, con niveles disminuidos, y elevados para el caso de las anemias sideroblásticas y/o APC ( $p < 0.05$ , IC: 95 %). La media de los niveles de Hpcidina con un valor de 26,26 ng/mL.

Se confirmó correlación entre los niveles de hepcidina y el diagnóstico diferencial de las anemias hipocrómicas, por lo que se propone para ser incluido en el perfil de pruebas para la detección temprana y el tratamiento oportuno de estos padecimientos.



**Palabras clave:** hepcidina, anemia, hierro

## INTRODUCCIÓN

El hierro es un micronutriente importante y fundamental en el funcionamiento hemostático en los seres vivos, ya que es clave en el transporte de oxígeno, la producción de hemoglobina y el proceso eritropoyético. La deficiencia o exceso del hierro sérico en el cuerpo, puede favorecer al desarrollo de diversas patologías, como los procesos inflamatorios, degeneración neurológica, neoplasias, alteraciones metabólicas y anemias.<sup>1</sup>

Las anemias son un problema de salud pública que afecta a un 24,8 % de la población global, en el cual, toda clase de grupos son susceptibles en algún momento de sus vidas, con mayor prevalencia en niños preescolares con un 47,4 % y en grupos de mujeres no embarazadas con una cifra de 468,4 millones de mujeres en el mundo. Los padecimientos asociados a una anemia hipocrómica son las anemias sideroblásticas, las talasemias (5 % de la población mundial es portadora del gen), anemias asociadas a enfermedades crónicas y la anemia por deficiencia de hierro, siendo esta última la que presenta mayor prevalencia globalmente.<sup>2</sup>

La hepcidina es una hormona peptídica de reciente documentación, debido a su descubrimiento en el año 2000, es sintetizada principalmente en el hígado como un péptido de 25 aminoácidos de longitud, estabilizados por 4 puentes disulfuro, su forma bioactiva es la hepcidina-25 y se ha encontrado en bajas concentraciones en el corazón, páncreas, pulmones y células hematopoyéticas.

En años recientes se ha demostrado que la hormona hepcidina es una pieza clave en la regulación del hierro en células como enterocitos, hepatocitos y macrófagos, en conjunto con la proteína ferroportina, la cual es el exportador de hierro intracelular, principalmente en células como enterocitos duodenales, macrófagos y hepatocitos.<sup>3</sup>

La hepcidina es liberada a la sangre en respuesta a los niveles elevados de hierro sérico o a la instalación de procesos infecciosos o inflamatorios, se ha demostrado la relación entre la activación de interleucinas e interferones, con la expresión de hepcidina, por lo que es considerado un péptido antimicrobiano, induciendo un estado de hipoferremia.<sup>4</sup>

La regulación del hierro a nivel intestinal es modulado por la hepcidina, actuando como un inhibidor de la ferroportina, cuando existe disminución en la concentración de hepcidina, el hierro entra al plasma en grandes cantidades, por lo contrario, si la hepcidina incrementa, esta se une a la ferroportina, causando su internalización y degradación en el enterocito, lo cual reduce el flujo de hierro proveniente de la dieta al torrente sanguíneo, atrapando al hierro en los enterocitos en forma de ferritina, al igual que la hepcidina regula el flujo de hierro a nivel intestinal también lo hace en los macrófagos involucrados en el reciclado férrico proveniente de eritrocitos viejos y en los hepatocitos evita la exportación del hierro almacenado, a través del mismo mecanismo.<sup>4</sup>

## OBJETIVOS

*General:* Asociar los niveles séricos de la hormona hepcidina con parámetros hematológicos en pacientes con trastornos del metabolismo del hierro para incluirla como un marcador de diagnóstico diferencial de anemias hipocrómicas.

*Específicos:*

- Determinar la media de la concentración de hepcidina sérica en una población de estudiantes femeninas aparentemente sanas, de la Universidad Autónoma de Baja California, campus Tijuana. B. C, México.
- Proponer un perfil de diagnóstico diferencial de las anemias hipocrómicas incluyendo la cuantificación de hepcidina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

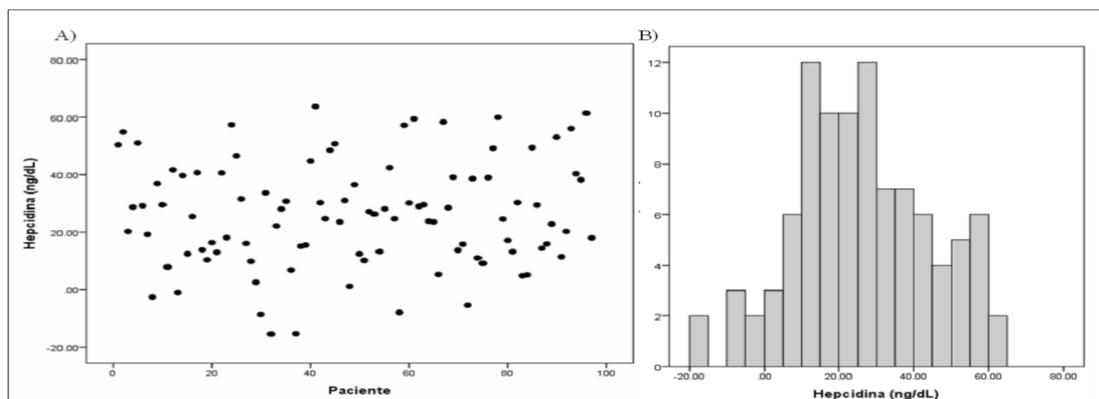
El estudio se llevó a cabo en la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), campus Tijuana, entre octubre a noviembre de 2015. La población estudio fue una muestra calculada de 127 estudiantes femeninas que participaron de manera voluntaria y con firma de consentimiento informado. Se consideraron los siguientes criterios de inclusión: ser estudiante de la UABC, campus Tijuana, entre 18 a 26 años de edad, muestras de sueros conservadas de 2 a 8 °C por no más de 24 hrs, así como muestras de suero congeladas a -20 °C por no más de 12 meses. Se cuantificaron los parámetros hematológicos convencionales (Hemoglobina (Hb), volumen globular medio (VGM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración media de hemoglobina corpuscular (CMHC) con contador de células (ADVIA-60TC). Entre las variables del perfil férrico se determinó ferritina (Spinreact), transferrina e hierro sérico (Pointe), capacidad de fijación total de hierro (CTFH) e índice de saturación de la transferrina (IST). Para identificar los casos de anemia hipocrómica y para establecer el diagnóstico diferencial de anemia ferropénica, sideroblástica ó asociada a padecimientos crónicos.

*Determinación de hepcidina sérica:* Las muestras de suero congeladas pasaron por un proceso de descongelación lenta, llevándolas de -20°C del congelador a una temperatura de 2-8 °C en el refrigerador por 24 horas, posteriormente se estabilizó la muestra a temperatura ambiente. Se calibró el Lector (Eliread 2100c) atemperado y listo para realizar las lecturas de las muestras. Se analizaron de 16 a 24 muestras simultáneas y se cuantificaron por inmunoensayo (DGR Hepcidin25-HS). La placa contiene 96 pocillos de poliestireno recubiertos con anticuerpos anti-hepcidina-25 monoclonal (Incluida en el Kit DGR Hepcidin-25 HS), se realizó una curva de calibración utilizando los reactivos estándares; estándar 0 (0 ng/mL), estándar 1 (1 ng/mL), estándar 2 (3 ng/mL), estándar 3 (9 ng/mL), estándar 4 (27 ng/mL) y estándar 5 (81 ng/mL), se adiciono a cada pocillo 20µL de cada estándar, control (alto y bajo), así como de cada muestra a analizar, utilizando entre cada muestra una puntilla nueva, después se dispensaron 50 µL del conjugado enzimático (Hepcidina 25-Biotina) a 23 y = -0.0221x + 2.2081 R<sup>2</sup> = 0.988 0 0.5 1 1.5 2 2,5 0 20 40 60 80 100, se mezcló por 10 s con movimientos circulares, se cubrió con un pedazo de parafilm y se incubó a temperatura ambiente durante 60 min. Posteriormente se decantó el contenido y se realizaron 4 lavados con 300 µL de la solución de lavado y se extrajo el contenido líquido a través de golpes en seco sobre un papel absorbente, se repite el proceso hasta dejar sin

liquido cada pocillo. Se adicionan 100  $\mu$ L del complejo enzimático (Estreptavidina con peroxidasa de rábano) para que se una por medio del complejo Biotina-Estreptavidina, mezclar por 10 s con movimientos circulares, cubrir con Parafilm e incubar durante 30 min. Pasado el periodo de incubación se decanta el contenido líquido y se repite el proceso de lavado con 300  $\mu$ L de solución y secado hasta que no haya contenido liquido en cada pocillo. Se agregan 100  $\mu$ L de la solución de sustrato a cada pocillo y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente. Concluido el tiempo se detiene la reacción adicionando 100  $\mu$ L de la solución de parado (*Stop solution*) a cada pocillo y se lee la densidad óptica (DO) por duplicado a 450nm (Coeficiente de Correlación Intraclase CCI=0.991), dentro de los 10 min después de la adición de la solución de parado. Los cálculos se realizaron utilizando las absorbancias medias para cada conjunto de estándares y muestras de los pacientes, correlacionando la absorbancia en el eje Y la concentración de hepcidina (ng/dL) en eje X.

## RESULTADOS

Se confirmó diagnóstico de anemia hipocrómica en el 24 % de la población en estudio. El 32 % presentó valores fuera de rango en los niveles de Hecpidina. Se confirmó anemia ferropénica (AF) (82,8 %), sideroblástica (AS) (17,2 %) y (3,4 %) asociada a padecimientos crónicos (APC). Se demostró una diferencia estadísticamente significativa de los niveles de hepcidina entre la población con y sin diagnóstico de anemia hipocrómica, 57 % en el caso de las estudiantes con diagnóstico de anemia en comparación con un 34 % de las que no la presentaban ( $p < 0,05$ , IC:95 %). Se confirmó una correlación entre los niveles de hepcidina y ferritina para las anemias ferropénicas, presentando en ambos parámetros, niveles disminuidos ( $p < 0,05$ , IC:95 %). Para las anemias Sideroblásticas, correlación entre los niveles de hepcidina y ferritina, mostrando valores elevados ( $p < 0,05$ , IC: 95 %). Se identificó una media de los niveles de Hecpidina con un valor de 26,26 ng/mL en la población en estudio. (Figura)



Figuras. Niveles de hepcidina en población de estudiantes universitarias A) Histograma de distribución de las concentraciones de hepcidina (ng/dL), b) Grafica de frecuencias agrupadas de las concentraciones de hepcidina en la población (n=97).  $\bar{x}$  =26,26 ng/mL,

La concentración de la hepcidina sérica, es un marcador de apoyo en el diagnóstico de diversos trastornos asociados a las anemias hipocrómicas, se demostró un comportamiento similar en la disminución de los niveles de hepcidina y ferritina en el caso de las anemias ferropénicas y el incremento en el caso de las anemias sideroblásticas, por lo que se propone a la hepcidina como un nuevo parámetro para ser incluido en el perfil de pruebas de rutina, para la detección temprana de padecimientos como las anemias hipocrómicas con la posibilidad de un tratamiento oportuno de estas enfermedades mediante el desarrollo de antagonistas de la hepcidina para lograr la homeostasis del metabolismo del hierro y evitar las complicaciones implicadas en estos padecimientos. Se destaca que la media en los valores de hepcidina de 26,26 ng/mL en esta población mexicana estudiada es lo doble e incluso tres veces mayor que en otros países, población Alemana con 11,02 ng/mL, Pakistán 13,2 ng/mL, Arabia Saudita 13.80 ng/mL y en población de Bulgaria es de 7,9 ng/mL.<sup>1,5</sup>

## CONCLUSIONES

Se propone a la hepcidina como un nuevo parámetro para ser incluido en el perfil de pruebas de rutina para la detección temprana de padecimientos como las anemias hipocrómicas con la

posibilidad de un tratamiento oportuno de estas enfermedades mediante el desarrollo de antagonistas.



## RECOMENDACIONES

Es necesario determinar los índices biológicos de referencia de la concentración sérica de hepcidina en población mexicana, para evitar sesgo en las mediciones que se encuentran en valor límite alto o bajo al que maneja el valor de referencia del kit (DGR International) y la influencia de otras variables como; aspectos nutricionales, rangos de edades, horario para la toma de muestra por su posible variación en el transcurso del día. Se sugiere ampliar este tipo de estudios epidemiológicos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Arezes J, Nemeth E. Heparin and iron disorders: new biology and clinical approaches. *Int J Lab Hematol.* 2015;37(Suppl 1): 92-8. doi: 10.1111/ijlh.12358.
2. Barbella S, Latouche G, Conde A. Etapas de la deficiencia de hierro y anemia ferropénica en niños de la comunidad de Miguel Peña. Valencia 2011-2012. *VITAE* 2013 Jul-Sept;55.
3. Manolo B, Atanasova M, Velizarova V. Vasilev KT. Serum hepcidin levels in Bulgarian population. *Clin Lab.* 2014;60(12): 2001-6.
4. Naqvi SH, Naqvi SFH, Naqvi IH, Farhan M, Abbas T, et al. Serum Heparin: Its Correlation with Serum Ferritin, Serum Iron and Hemoglobin in Patients of Iron Deficiency Anemia. *IEMAMC.* 2014;14 (2): 105-13.
5. Mahmoud ME, Al OF, Mohammed S, Kurdi M, Ibrahim NA. Role of serum hepcidin levels in the diagnosis of iron deficiency anemia in children in Saudi Arabia. *Am J Res Comm.* 2015;3(7): 24-30.