

DETERMINACIÓN SÉRICA DE PRO-HEPCIDINA EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDEA ANÉMICOS Y SU CORRELACIÓN CON LA HEMOGLOBINA E INFLAMACIÓN

Visintini María Cristina¹, Vergottini Juan Carlos², Mussano Eduardo Daniel³, Ferrero Virginia Paola⁴, Moyano María Cecilia⁵, Brusa Mariana⁶, Sesin Ana María⁷

¹División Hematología Laboratorio Central HNC, ²Jefe Terapia Intensiva HNC, ³Jefe Servicio de Reumatología HNC, ⁴ Laboratorio de Inmunología y Virología HNC, ⁵Hospital Misericordia Nuevo Siglo, Córdoba, ⁶Docente Servicio de Nefrología HNC, ⁷Jefe Servicio de Nefrología Hospital Nacional de Clínicas.

*Realizado en Hospital Nacional de Clínicas Autor responsable: Visintini María Cristina
Correo electrónico mcvisintini@gmail.com TE:0351-4611027*

RESUMEN

Introducción. La pro-hepcidina (pro-HEP) es el precursor de la Hepcidina, hormona reguladora de la homeostasis del hierro y mediadora de la Anemia de la Enfermedad Crónica (ejemplo Artritis Reumatoidea). **Objetivos:** 1) determinar los niveles séricos de pro-HEP en pacientes anémicos con Artritis Reumatoidea (AR) y en un grupo control 2) Comparar los niveles de pro-HEP en pacientes con AR ferropénicos, no ferropénicos y grupo control 3) Correlacionar los niveles de pro-HEP con la hemoglobina, ferritina y velocidad de sedimentación globular (VSG). **Materiales y Métodos:** estudio transversal de casos y controles. Pacientes: 12 mujeres adultas con AR. Grupo control: 14 mujeres sanas. Se realizó: cuantificación de pro-HEP sérica, Hemograma, Reticulocitos, Ferremia, Capacidad Total de Fijación del Fe, Ferritina y VSG. **Resultados:** Los Niveles de pro-HEP en pacientes con AR ($155,3\text{ng/mL} \pm 103,7\text{ng/mL}$) no mostraron diferencia significativa con el grupo control ($222,8\text{ng/mL} \pm 79,8\text{ng/mL}$), $p=0,073$. Al comparar los niveles de pro-HEP entre AR ferropénicos ($n= 7, 142,7 \text{ ng/mL} \pm 110,67 \text{ ng/mL}$), AR no-ferropénicos ($n= 5, 172,9 \text{ ng/mL} \pm 102,77 \text{ ng/mL}$) y el Grupo Control ($n= 14, 222,87 \text{ ng/mL} \pm 79,87 \text{ ng/mL}$) no hubo diferencia significativa, $p=0,19$. Los valores de pro-HEP no se correlacionaron con los de ferritina ($r=0,09, p=0,78$), ni VSG ($r=0,19, p= 0,57$), como así tampoco con la Hemoglobina ($r= 0,22 p= 0,50$). **Conclusión:** Los pacientes AR no presentaron niveles aumentados de pro-HEP, no mostraron correlación significativa con la hemoglobina ni los marcadores de la inflamación evaluados. La pro-HEP no evidenció determinada por esta metodología ser la mediadora de la anemia en los pacientes estudiados.

Palabras clave: pro-hepcidina, hepcidina, inflamación, anemia de la enfermedad crónica, artritis reumatoidea.

INTRODUCCIÓN

La Artritis Reumatoidea (AR) ha servido como modelo para estudiar la Anemia de la Enfermedad Crónica (AEC) (1-2). A nivel mundial la AEC se ubica en segundo lugar, después de la anemia ferropénica y es la anemia más frecuente en los pacientes hospitalizados (2). De allí la importancia en tratar de esclarecer los mecanismos involucrados en su etiología, su diagnóstico y prevención. Numerosos trabajos postulan a la Hepcidina (HEP) como mediador responsable de la AEC (3-5). La HEP se aisló por primera vez en orina y su cuantificación en sangre se ha visto limitada por la falta de métodos analíticos para tal fin (6). Desde el año 2004 se cuenta con métodos diagnósticos que determinan en suero su precursor la pro-HEP, prohormona de 84 aminoácidos. Éste es sintetizado en el hígado, se distribuye en el plasma y excreta por orina (7). En la AR hay aumento de citoquinas proinflamatorias como Interleuquina (IL)-1, IL-6, Factor de Necrosis Tumoral (FNT)- α que no puede ser contrarrestado por las citoquinas anti-inflamatorias como la IL-1Ra y la IL-10, ocasionando la inflamación crónica característica de esta enfermedad (8). Dentro de los mediadores de la inflamación estaría la HEP que además actuaría como reguladora del metabolismo del hierro (Fe) (9-11). La presencia de anemia en pacientes con AR activa, es la manifestación sistémica más frecuente, y puede coexistir con déficit de Fe. De hecho, entre un 30% a 50% de los pacientes podrían presentar anemia y el 15% de ella podría ser ferropénica, generalmente asociada a pérdidas sanguíneas gastrointestinales por la ingesta de fármacos antiinflamatorios (12-14). En la AR la eritropoyesis requiere una cantidad de Fe mayor a la disponible en plasma, y a ese “disbalance” se atribuiría al aumento de HEP, el cual sería responsable de reducir la liberación del Fe de depósito y su absorción (2, 10,14-16). El objetivo del presente estudio fue determinar los niveles séricos de pro-HEP en pacientes anémicos con AR y un grupo control, comparar los niveles de pro-HEP en pacientes con AR ferropénicos, no ferropénicos y grupo control y correlacionar la pro-HEP con los niveles de hemoglobina (Hb), ferritina y velocidad de sedimentación globular (VSG).

MATERIALES Y MÉTODOS:

Se realizó un estudio transversal de casos y controles.

Pacientes: Se incluyeron 12 mujeres anémicas, entre 40 y 78 años, con diagnóstico de AR según criterios ACR/EULAR 2010 (17), admitidas en el Servicio de Reumatología del Hospital Nacional de Clínicas entre febrero de 2011 y agosto de 2012. Se consideró presencia de anemia cuando el valor de Hb fue < 12 g/dL. Este grupo se subdividió en dos, (A) anemias ferropénicas, cuando el Índice de Saturación de la Transferrina (IST) fue menor al 15% y (B) no ferropénicas cuando el IST estuvo entre 20-55%. En el grupo control participaron 14 mujeres voluntarias saludables, sin AR, ni otra patología autoinmune y sin síntomas de enfermedad al momento de la toma de la muestra. Este protocolo de trabajo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Nacional de Clínicas. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado. A las muestras de sangre, anticoaguladas con EDTA K3, de las pacientes y grupo control se les realizaron las siguientes determinaciones: hemograma completo (Coulter T 660), recuento de reticulocitos por método manual, y las muestras anticoaguladas con citrato de Na (3.8%) VSG por método manual y citrato de Na (3.2%) cuantificación de fibrinógeno por método gravimétrico. Se empleó suero para la cuantificación de ferritina sérica (método Inmunoturbidimétrico, Autoanalizador Cobas 6001 de Roche), sideremia y capacidad total de fijación de Fe (TIBC) por método automatizado que utiliza Ferene como cromógeno (Dimension de Siemens).

Cuantificación de Pro-hepcidina Luego de la coagulación a temperatura ambiente, la muestra de sangre se centrifugó 10 minutos a 4000 rpm y a 4°C. Los sueros se conservaron a -20°C hasta el momento de su procesamiento. Se utilizó un ensayo inmunoenzimático (EIE competitivo) (Hepcidin Prohormone ELISA, DRG Instruments GmbH, Marburg, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente: se incubaron los estándares, el control y las muestras con prohepcidina biotinilada. Se procedió al lavado y agregado de streptavidina conjugada a peroxidasa, se lavó nuevamente y se adicionó el sustrato de la enzima (3'3'5'5'tetrametilbencidina). Después de esta última incubación se frenó la reacción con ácido sulfúrico (H₂SO₄) leyendo el producto final a 450 nm con lector de microplacas Sirio S (SEAC, RADIM, Roma, Italia). Finalmente, se graficó una curva estándar de densidad óptica (DO) vs concentración (ng/mL) para el cálculo de la concentración de pro-HEP con el estándar provisto. La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de la pro-HEP en la muestra.

Análisis estadístico: Para los cálculos estadísticos se utilizó el programa MedCalc versión demo. Los niveles de pro-HEP entre pacientes con AR y grupo control, se compararon a través de test *t* de Student de muestras independientes. La comparación de los valores de pro-HEP entre pacientes ferropénicos (A), no ferropénicos (B) y grupo control se realizó a través de ANOVA de una vía. Para los análisis de correlación se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. Se consideraron estadísticamente significativa un $p < 0,05$. Los valores fueron expresados como Media \pm DS.

RESULTADOS

En la **Tabla 1** se presentan los parámetros hematológicos en los pacientes con AR.

Tabla 1. Parámetros hematológicos en pacientes con Artritis Reumatoidea.

Parámetro (n =12)	Valor obtenido (media \pm DS)	Rango	Valores de Referencia
Hb (g/dL)	9,5 \pm 1,9	5,9 - 11,3	12,0 - 14,5
VCM (fL)	80,5 \pm 12,1	65,9 - 96,4	80,0 - 99,0
HCM (pg)	25,2 \pm 5,3	19,3 - 33,9	27,0 - 31,0
Fe (μ g/dL)	39 \pm 26	8 - 93	37 - 145
TIBC (μ g/dL)	343 \pm 114	242 - 570	259 - 400
IST (%)	13 \pm 9	2 - 25	20 - 55
Reticulocitos($\times 10^9/L$)	50 \pm 38	10 - 140	25 - 75

n: número de muestras; DS: desvío estándar; Hb: hemoglobina; VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media; Fe: sideremia; TIBC: capacidad total de fijación del hierro; IST: porcentaje de saturación de la transferrina.

Se incluyeron como marcadores de inflamación, la VSG, la ferritina y el fibrinógeno. Los resultados se detallan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Marcadores de inflamación en pacientes con Artritis Reumatoidea.

Parámetro (n =12)	Valor obtenido (media \pm DS)	Rango	Valores de Referencia
----------------------	------------------------------------	-------	-----------------------

VSG (mm/h)	34 ± 32	9 – 107	M: 0 – 15
Ferritina (ng/mL)	92 ± 111	5 – 365	5 – 277 *
Fibrinógeno (mg%)	363 ± 81	264 – 540	200 – 400

n: número de muestras; VSG: velocidad de sedimentación globular. (*) Post menopausia

En la **Tabla 3** se muestran los valores obtenidos de pro-HEP del grupo de pacientes con AR y el grupo control.

Tabla 3. Concentración de pro-Hepcidina Sérica en AR y Grupo Control.

ProHepcidina	Grupo Control (n=14) (media ± DS)	Pacientes (n=12) (media ± DS)
expresada en ng/mL	222,8± 79,8	155,3 ± 103,7
Rango	137,1 – 422,3	13,4– 350,3

No se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los niveles de pro-HEP entre los pacientes AR y el grupo control (p=0,073), (Figura 1).

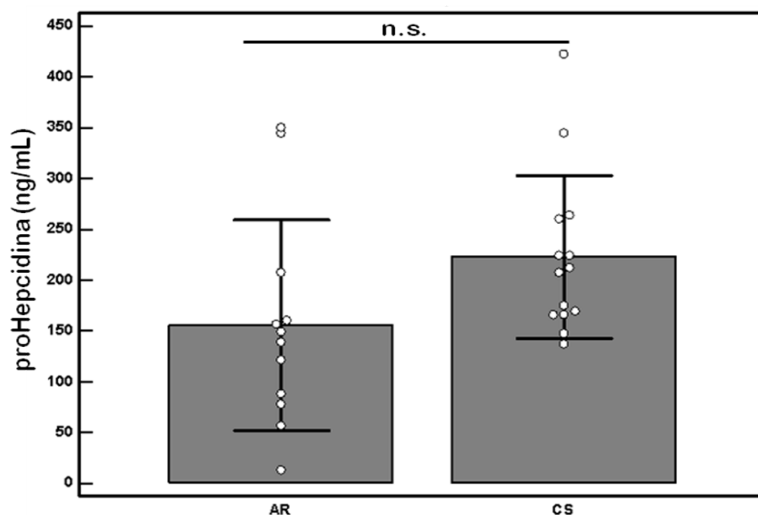


Figura 1: Niveles de proHepcidina (proHEP) en pacientes con artritis reumatoidea (AR) y controles saludable (CS). Test *t* de muestras independientes, p=0,073 , n.s.= no significativo

Tampoco se hallaron diferencias significativas entre los niveles de pro-HEP de los AR

ferropénicos (n= 7, 142,67 ng/mL \pm 110,60), AR no ferropénicos (n= 5, 172,92ng/mL \pm 102,71) y grupo control (n=14, 222,8ng/mL \pm 79,8 (p= 0,19) Figura 2.

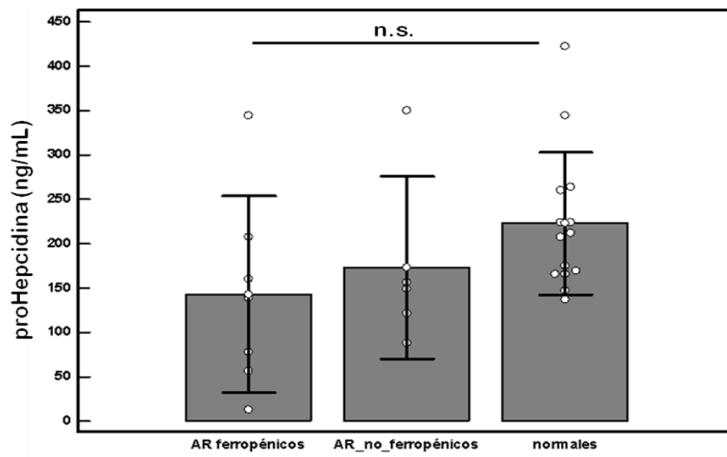


Figura 2: valores de proHEP en pacientes con AR ferropénicos, AR no ferropénicos y control saludable (CS). Test de ANOVA de una vía, p= 0,19, n.s.= no significativo.

En la Figura 3 se observa que los niveles de pro-HEP no se correlacionan con la concentración de Hemoglobina (r= 0,22, p= 0,50).

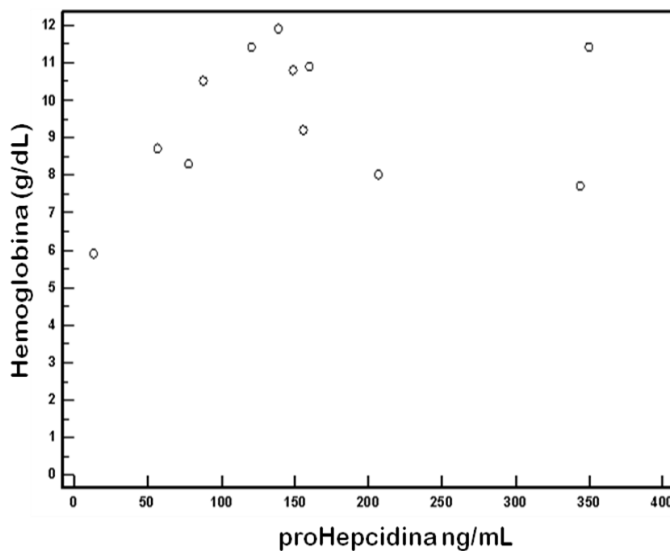


Figura 3: Correlación entre Hemoglobina y prohepcidina en pacientes con AR. Coeficiente de correlación de Pearson r= 0,22, p= 0,50.

Asimismo, tampoco se observó correlación entre la pro-HEP con los indicadores de inflamación: fibrinógeno, ferritina y VSG; pro -HEP vs ferritina (r = 0,09 p=0,78), pro-HEP vs VSG (r =0,19 p =0,57) y pro-HEP vs fibrinógeno (r= 0,47 p= 0,152).

Discusión

La cuantificación de HEP y pro-HEP todavía no son parte de los análisis especializados y menos aún de rutina que habitualmente se realizan en el laboratorio bioquímico. En nuestro trabajo cuantificamos la pro-HEP y no obtuvimos diferencias significativas entre los valores de pro-HEP en los pacientes con AR respecto al grupo control. Cuando dividimos los pacientes AR en ferropénicos y no ferropénicos la concentración de pro-HEP fue menor en los AR ferropénicos que los no ferropénicos, pero al analizar los datos estadísticamente estas diferencias no fueron significativas. Con respecto a los indicadores de la inflamación no obtuvimos correlación significativa entre pro-HEP vs ferritina, vs VSG ni vs fibrinógeno. Numerosos trabajos (3,8,15-16,18-19) mencionan que en pacientes con procesos inflamatorios crónicos como la AR los niveles de HEP son superiores a los valores normales y hay correlación entre la HEP y ferritina, a mayor concentración de HEP mayor nivel de ferritina sérica. El aumento de la HEP indicaría un proceso inflamatorio crónico y si hay anemia podríamos decir que la misma está asociada a un proceso crónico AEC (1,13-16,20). Sin embargo nuestros resultados no coincidieron con dichos hallazgos. Esta discordancia podría atribuirse a que determinamos pro-HEP y no HEP. Además, es probable que nuestro grupo de pacientes en el momento en que se tomaron las muestras hayan tenido comorbilidades (hipertensión, enfermedad cardíaca) que pudieron influir en los valores encontrados. Otros factores podrían explicar la falta de correlación entre la pro-HEP y parámetros inflamatorios, así como en el estudio publicado por Rivera y col (21) hallaron una Vida $\frac{1}{2}$ corta de la HEP informada esto podría suceder con la pro-HEP. Si tenemos en cuenta el trabajo de Sasu y col (22) que postula que la pro-HEP sería un analito inestable en suero y que la conservación y manipulación de las muestras podría causar variabilidad en los resultados, esto podría también justificar nuestros resultados. Dado el difundido empleo del kit de pro-HEP para cuantificar la HEP en suero, Sasu y col en 2010 (22) realizaron un estudio de comparación de métodos y demostraron que la cuantificación de pro-HEP con el kit DRG no es un método confiable para cuantificar HEP sérica. Por otra parte, Taheri y col en 2015 (23), estudiando pacientes en diálisis no encontraron correlación entre la concentración sérica de pro-HEP y la HEP. Igualmente Roe et al en 2007 (24), afirmó

que la pro-HEP no es un marcador útil para el diagnóstico clínico y Brookes et al. 2005 (25), encontraron que es posible que el anticuerpo empleado para detectar la pro-HEP sérica reconozca un precursor no funcional de la HEP y no su forma activa. **La conclusión** de nuestro trabajo es que la pro-HEP no evidenció, determinada por esta metodología (Kit DRG para la cuantificación de la prohormona) ser la mediadora de la anemia en los pacientes estudiados, dado que los pacientes con AR no presentaron niveles aumentados de pro-HEP, ni mostraron correlación significativa con la hemoglobina ni los marcadores de la inflamación evaluados.

Por esta razón, a pesar del enorme interés en el rol que desempeña la HEP, la falta de métodos confiables para su cuantificación ha restringido la cantidad y calidad de datos publicados (23,26). Lo cual, pone en evidencia la urgente necesidad de desarrollar un método confiable y exacto para cuantificar la forma circulante de la HEP, que pueda emplearse tanto para el diagnóstico clínico como para investigación.

Agradecimientos: al Jefe del Laboratorio Central del Hospital Nacional de Clínicas Dr. Gustavo Diserio, a los Bioquímicos del Laboratorio Central del Hospital Nacional de Clínicas que realizaron las determinaciones analíticas y en particular a los integrantes de la División de Hematología.

Mi recuerdo personal para la Dra. Beatriz Pacheco de Rupil.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Robert T. Means, Jr, and Sanford E. Krantz Review "Progress in Understanding the Pathogenesis of the Anemia of Chronic Disease" *Blood* 1992; 80:1639-1647
- 2) Guenter Weiss, M.D., and Lawrence T. Goodnough, M. "Anemia of Chronic Disease" *N Engl J Med* 2005; 352:1011-1023
- 3) Dallalio G; Fleury T; Means T; "Serum hepcidin in clinical specimens" *Br J Haem* 2003;122:996-1000
- 4) E Nemeth, E V. Valore, Mary Territo, Gary Schiller, A Lichtenstein, and T Ganz "Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein" *Blood* 2003;101:2461-2463
- 5) Naohisa Tomosugi, Hiroshi Kawabata, Rumi Wakatabe, Masato Higuchi, Hideki Yamaya, Hisanori Umehara, and Isao Ishikawa "Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using Protein Chip System" *Blood* 2006;108:1381-1387
- 6) Y. Barrios, M. Espinoza y M. A. Barón "Pro-hepcidina, su relación con indicadores del metabolismo del hierro y de inflamación en pacientes hemodializados tratados o no con eritropoyetina recombinante" *Nutr Hosp.* 2010; 25 :555-560
- 7) Kulaksiz H, Gehrke S, Janetzko A, Rost D, Bruckner T, Kallinowski B, Stremmel W." Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia". *Gut* 2004; 53: 735-743.
- 8) Mehmet Derya Demirag, Seminur Haznedaroglu, Banu Sancak, Ceyla Konca, Ozlem Gulbahar, M. Akif Ozturk and Berna Goker "Circulating Hepcidin in the Crossroads of Anemia and Inflammation Associated with Rheumatoid Arthritis" *Inter Med* 2009;48: 421-426
- 9) Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, et al. "IL-6 mediates hypoferraemia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin" *J Clin Invest* 2004;113: 1271-1276
- 10) Mark D. Fleming "The Regulation of Hepcidin and Its Effects on Systemic and Cellular Iron Metabolism" *Hematology* 2008:151- 8
- 11) Ivana De Domenico, Diane M. Ward, and Jerry Kaplan "Hepcidin regulation: ironing out the details" *J Clin Invest* 2007; 117:1755–1758
- 12) Peeters HR, Jongen-Lavrencic M, Raja AN, et al. "Course and characteristics of anaemia in patients with rheumatoid arthritis of recent onset". *Ann Rheum Dis* 1996;**55**: 162-168

- 13) Remacha AF, Rodríguez de la Serna A, García –Die F, et al “Erythroid Abnormalities in rheumatic arthritis: The role of erythropoietin” *J Rheumatoid* 1992;19:1687
- 14) Sumeet Agrawal ÆRamnath Misra Æ Amita Aggarwal “Anemia in rheumatoid arthritis: high prevalence of iron-deficiency anemia in Indian patients” *Rheumatol Int* 2006;26: 1091–1095
- 15) Manal Aly, Abdel Khalek, Amal M El-Barbary, Salwa A-Moneim Essa and Abeer Saeed Ghobashi “Serum Hcpidin: A Direct Link Between Anemia of Inflammation and Coronary Atherosclerosis in Patients with Rheumatic Arthritis” *J Rheumatol* 2011;38:2153-9
- 16) T. Thalhamer, M. A. McGrath and M. M. Harnett “Signalling, inflammation and arthritis MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation” *Rheumatology* 2008;47:409–414
- 17) Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. “Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative”. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1580-8
- 18) Kim HR¹, Kim KW, Yoon SY, Kim SH, Lee SH. “Serum Pro-hepcidin Could Reflect Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis” *J Korean Med Sci* 2010; 25: 348-52
- 19) Charles Masson Review “Rheumatoid anemia” *Joint Bone Spine* 2011; 78: 131–137
- 20)) Ferguson B; Skikne B; Simpson K: “Serum Trasferrin receptor distinguishes the anemia of chronic disease from Iron deficiency anemia” *J Lab Clin Med* 1992;19:385-390
- 21) S. Rivera, E. Nemeth, V. Gabayan, M.A. Lopez, D. Farshidi, T. Ganz, “Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferremia and is concentrated in ferroportin-containing organs” *Blood* 2005;106:2196–2199
- 22) Barbra J. Sasu , Hongyan Li, Mark J. Rose, Tara L. Arvedson, George Doellgast, Graham Molineux “Serum hepcidin but not prohepcidin may be an effective marker for anemia of inflammation (AI)” *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2010;45: 238–245
- 23) N. Taheri, Gh. Roshandel, M. Mojerloo, M. Hadad, H. Mirkarimi, R. KhorasaniNejad, H. R. Joshaghani “Comparison of Serum Levels of Hcpidin and

Pro-hepcidin in Hemodialysis Patients and Healthy Subjects” Saudi J Kidney Dis Transpl 2015;26(1):34-38

24) Mark A. Roe, Caroline Spinks, Anne-Louise M. Heath, Linda J. Harvey, Rob Foxall, Jennie Wimperis, Christian Wolf and Susan J. Fairweather-Tait “Serum prohepcidin concentration: no association with iron absorption in healthy men; and no relationship with iron status in men carrying HFE mutations, hereditary haemochromatosis patients undergoing phlebotomy treatment, or pregnant women” British Journal of Nutrition (2007), 97, 544–549

25) Brookes MJ, Sharma NK, Tselepis C & Iqbal TH “Serum prohepcidin: measuring active hepcidin or a non-functional precursor?” Gut 2005;54: 169–170

26) Li, M.J. Rose, L. Tran, J. Zhang, L.P. Miranda, C.A. James, B.J. Sasu, “Development of a method for the sensitive and quantitative determination of hepcidin in human serum using LC-MS/MS”, J. Pharmacol. Toxicol. Methods 2009; 59: 171–180