EFECTO DEL POLIMORFISMO DEL PROMOTOR DE LA IL-6 SOBRE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN PACIENTES CON SOBRECARGA DE HIERRO PRIMARIA

Seudónimo: AMANTES DE LA BIOQUÍMICA CLÍNICA.

Resumen

Introducción: La sobrecarga de hierro (SH) primaria abarca un grupo de enfermedades hereditarias que afectan al metabolismo del hierro y que han sido vinculadas a un estado proinflamatorio y, consecuentemente, a mayor riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV). Entre los marcadores de inflamación asociados a ECV, susceptibles de estar alterados en los pacientes con SH, se destacan la proteína C reactiva ultrasensible (PCRus) y la interleuquina 6 (IL-6). Existe una variante polimórfica de nucleótido simple (SNP) en la posición -174 (G/C) del promotor del gen de la IL-6, que regula su actividad transcripcional. La presencia de esta variante polimórfica podría asociarse a la acumulación de hierro, al proceso inflamatorio y al riesgo de ECV. **Objetivos:** Evaluar el SNP -174 G/C del promotor gen de la IL-6 y su interacción con los parámetros ferrocinéticos, las alteraciones metabólicas, los marcadores de inflamación y los factores de riesgo y biomarcadores de ECV en pacientes con SH primaria y controles. **Materiales y métodos:** Se estudiaron 37 pacientes masculinos con SH primaria diagnosticada por biopsia hepática en comparación con sujetos controles pareados por sexo y edad. Se evaluaron parámetros bioquímicos generales, la ferremia y la transferrinemia por métodos estandarizados, se midió la ferritina por electroquimioluminiscencia y se calculó la saturación de transferrina. Se determinó la concentración de PCRus por inmunoturbidimetría ultrasensible automatizada y la de IL-6 por enzimoinmunoensayo. En el grupo de pacientes, se midió la concentración de la hormona hepcidina, involucrada en el metabolismo del hierro, por cromatografía líquida con detector de espectrometría de masa en tándem. Se realizó la genotipificación del gen HFE y se evaluó el SNP-174 G/C del promotor del gen de la IL-6 por PCR-RFLP. Se analizaron

los datos mediante test T de Student o U Mann-Whitney y se efectuó análisis de regresión logística múltiple empleando a la SH como variable dependiente y a la homocigosis CC, heterocigosis CG, PCRus, IL-6, ferremia, ferritina y saturación de transferrina como variables independientes. **Resultados:** Como era esperado, la ferremia, la ferritina y la saturación de transferrina fueron mayores en los pacientes con SH. Con respecto a los marcadores de inflamación, la PCRus fue mayor [Mediana (Q1-Q3); 1,7 (1,3-2,5) *vs*. 0,9 (0,6-1,6) mg/l; p<0,05] y la IL-6 menor [0,2 (0,1-0,4) *vs*. 0,3 (0,2-0,6) pg/ml; p<0,05] en el grupo de pacientes. El 73 % de los pacientes con SH presentó alguna de las mutaciones evaluadas en el gen HFE (C282Y y/o H63D). El análisis del polimorfismo del SNP-174 G/C del promotor del gen de la IL-6 mostró frecuencias genotípicas significativamente diferentes entre pacientes (43%CC, 43%CG y 14% GG) y controles (10%CC, 41%CG y 49%GG) (OR=4,094, IC95%=2,062-8,128, p<0,0001), encontrándose en equilibrio de Hardy-Weinberg. El análisis de regresión logística múltiple reveló que la SH se asociaba independiente y significativamente, en primer lugar, a la homocigosis CC (Estimación de OR: 22,517, p=0,02) y, luego, a la saturación de transferrina y a la ferritina. **Conclusiones:** En el grupo de pacientes con SH primaria, se observó mayor frecuencia del alelo C en el promotor del gen de la IL-6, condicionando ello la presencia de menores niveles circulantes de IL-6. A través de su relación con la expresión de hepcidina, la disminución de IL-6 acentuaría las alteraciones del metabolismo del hierro en los pacientes con SH, los cuales presentaron un estado proinflamatorio caracterizado por aumento de PCRus.

Palabras clave: Sobrecarga de hierro; inflamación; IL-6; polimorfismo; enfermedad cardiovascular.

Abstract

EFFECT OF GENE PROMOTER POLYMORPHISM OF IL-6 ON BIOCHEMICAL PARAMETERS IN PATIENTS WITH PRIMARY IRON OVERLOAD

Introduction: Primary iron overload (IO) comprises a group of inherited diseases that affect iron metabolism and have been linked to a pro-inflammatory state and, consequently, to increased risk of cardiovascular disease (CVD). Among the markers of inflammation associated with cardiovascular disease, likely to be altered in patients with IO, ultrasensitive C-reactive protein (hsCRP) and interleukin 6 (IL-6) are the most relevant. There is a single nucleotide polymorphism (SNP) on position -174 (G/C) of the gene promoter of IL-6, which regulates the transcriptional activity. The presence of this polymorphic variant might be associated with iron accumulation, the inflammatory process and the risk of CVD. **Objectives**: To evaluate the SNP -174 G/C of the gene promoter of IL-6 and its interaction with iron-related parameters, metabolic disorders, inflammatory markers and risk factors and biomarkers of CVD in patients with primary IO and controls. **Materials and methods:** We studied 37 male patients diagnosed with primary IO by liver biopsy compared with control subjects sex and age-matched. General biochemical parameters, serum iron and transferrin were assessed by standard methods, ferritin was measured by electrochemiluminescence and transferrin saturation was calculated. HsCRP concentration was evaluated by automated ultrasensitive immunoturbidimetric assay and IL-6 by enzyme immunoassay. In the patient group, the hepcidin concentration, hormone involved in iron metabolism, was determined by liquid chromatography with tandem mass spectrometry detector. HFE genotyping and SNP-174 G/C gene promoter of IL-6 was evaluated by PCR-RFLP. Data were analyzed using

Student t test or Mann-Whitney U test, and logistic regression analysis was performed using IO as the dependent variable and the homozygous CC, heterozygous CG, hsCRP, IL-6, serum iron, ferritin and transferrin saturation as independent variables. **Results:** As expected, the serum iron, ferritin and transferrin saturation were higher in patients with IO. With regard to inflammatory markers, hsCRP was higher [Medium (Q1-Q3); 1.7 (1.3-2.5) *vs*. 0.9 (0.6-1.6) mg/l; $p < 0.05$] and IL-6 lower [0.2 (0.1-0.4) *vs*. 0.3 (0.2-0.6) pg/ml; $p < 0.05$] in the patient group. Seventy three percent of IO patients presented any of the evaluated mutations in the HFE gene (C282Y and/or H63D). The genotyping of the SNP-174 G/C gene promoter of IL-6 showed significantly different genotype frequencies between patients (43% CC, 43% CG and 14% GG) and controls (10% CC, 41% CG and 49% GG) (OR = 4.094, 95% CI = 2.062 to 8.128, $p < 0.0001$), being in Hardy-Weinberg equilibrium. The multiple logistic regression analyzes showed that IO was independently and significantly associated, firstly, to the CC homozygosis (OR Estimation: 22.517, $p = 0.02$) and then to the transferrin saturation and to ferritin. **Conclusions**: In the group of patients with primary IO, higher frequency of C allele in the gene promoter of IL-6 was observed, thereby conditioning the presence of lower circulating IL-6. Through its relationship with the expression of hepcidin, decreased IL-6 would accentuate the alterations of iron metabolism in patients with IO, who presented a pro-inflammatory state characterized by increased hsCRP levels.

Keywords: Iron overload; inflammation; IL-6; polymorphism; cardiovascular disease.

1. Introducción.

La sobrecarga de hierro primaria abarca un grupo de enfermedades hereditarias (1) que afectan el metabolismo del hierro, provocando una acumulación anormalmente elevada de este elemento esencial en los distintos órganos y sistemas (2). En estas condiciones hereditarias la expresión y/o regulación de proteínas y hormonas relacionadas con el metabolismo del hierro pueden estar afectadas (1,3). La causa principal de la SH primaria es la presencia de mutaciones en el gen HFE, las cuales se encuentran presentes en 1 de cada 200 sujetos caucásicos (4). El gen HFE participa en la regulación de la expresión de la hepcidina por los hepatocitos. Fisiológicamente, la hepcidina actúa en respuesta a un aumento del hierro en circulación, bloqueando su salida desde los sitios de depósito, a través de la degradación de la proteína ferroportina (5). Consecuentemente, en la SH primaria, el déficit de hepcidina causa un aumento desregulado de la absorción del hierro dietario y genera defectos en su almacenaje (6). Por lo tanto, la SH primaria se caracteriza por la observación histológica de siderosis hepatocelular. Entre las mutaciones del gen HFE que conducen a SH, la más común en la población anglosajona es la C282Y (7). En contraste, en nuestro país, un estudio de *screening* que evaluó la presencia de mutaciones en el gen HFE reveló que la mutación H63D fue la más prevalente, seguida por las mutaciones S65C y C282Y (8). Es de notar que hasta el momento no se han descripto diferencias significativas en el curso clínico de la enfermedad entre pacientes con distintos genotipos (7, 9). Alteraciones frecuentes asociadas a SH son las artropatías, la intolerancia a los hidratos de carbono, la diabetes, la hiperpigmentación y las hepatopatías, entre otras.

A partir del planteo de la hipótesis del hierro-corazón de Sullivan (10), se ha comenzado a estudiar la relación entre los niveles de hierro y el riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV). Originalmente, Sullivan postuló un efecto protector de la depleción de hierro y, luego, se realizaron diversos estudios para demostrar una asociación positiva entre la SH o el aumento de la concentración de ferritina y el riesgo de ECV. Mientras que algunos de estos estudios destacaron un mayor efecto en hombres, e inclusive una interacción entre el hierro y los niveles de colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (C-LDL), el tema aún resulta controvertido (11-14). Por otro lado, estudios en pacientes con SH describieron asociaciones entre la concentración de ferritina y el aumento de marcadores de inflamación, disfunción endotelial y aterosclerosis (15-17). No obstante, un metaanálisis reciente no detectó una asociación significativa entre la presencia de la mutación C282Y y el riesgo de ECV (18). Por lo tanto, las relaciones entre la SH, las mutaciones asociadas y el riesgo de ECV se encuentran escasamente definidas.

En la actualidad, la ECV aterosclerótica es concebida como una enfermedad inflamatoria de la vasculatura en la que diversos factores y condiciones están asociados a un desarrollo temprano de la patología (19, 20). Por lo tanto, numerosas moléculas propias del proceso inflamatorio son plausibles de ser utilizadas como biomarcadores o factores de riesgo de ECV. Entre éstas, se encuentran las moléculas de adhesión vascular (VCAM-1, ICAM-1 y selectina E), las interleuquinas (IL-1β e IL-6), el factor de necrosis tumoral (TNF)-α, la proteína C reactiva ultrasensible (PCRus) secretada por el hígado en respuesta a la estimulación por IL-6, el interferón (IFN)-γ, la fosfolipasa A_2 asociada a lipoproteínas (Lp-PLA_2), las proteínas quimiotácticas (fundamentalmente la proteína quimiotáctica de monocitos 1, MCP-1) y algunas metaloproteasas secretadas por macrófagos (21). Prácticamente, todos estos

biomarcadores inflamatorios han sido asociados a mayor riesgo de eventos cardiovasculares incidentes y recurrentes, así como el aumento de sus niveles se asoció a condiciones de alto riesgo cardiovascular (obesidad, síndrome metabólico, diabetes, etc.) (22). Si bien estos estudios demostraron el valor pronóstico de algunos marcadores inflamatorios, la aplicación clínica de los mismos aún es cuestionada en muchos casos. Las mayores limitaciones se fundamentan en la alta complejidad de las metodologías, el nivel de imprecisión analítica y el poco valor que agregan a los modelos de predicción basados en los factores de riesgo cardiovascular tradicionales (23). A partir de ésto, se desprende la necesidad de realizar estudios que evalúen la asociación entre estos marcadores inflamatorios y las distintas condiciones de elevado riesgo cardiovascular.

Entre los distintos factores de riesgo emergentes y biomarcadores de inflamación y aterosclerosis antes mencionados, cabe destacar a la IL-6 por la diversidad de actividades que puede llevar a cabo. De hecho, la IL-6 es una citoquina pleiotrópica implicada en la regulación de la reacción inflamatoria de fase aguda, en la respuesta inmune y en la hematopoyesis. Es una glicoproteína producida principalmente por macrófagos, leucocitos y, en algunos casos, por células endoteliales, del estroma del timo o de la médula ósea (24, 25). La IL-6 es considerada la citoquina más importante con efectos a distancia u hormonales y sus tres focos de mayor interés en la respuesta sistémica a la inflamación son el sistema nervioso, el hígado y la médula ósea, aunque no son los únicos.

El gen que codifica la IL-6 se localiza en el brazo corto del cromosoma 7 (7p21). En 1998, se describió por primera vez una variante polimórfica de nucleótido simple (SNP) en el promotor de este gen consistente en el reemplazo de una guanina por una citosina en la posición -174 (26). En este estudio llevado a cabo en pacientes con

artritis reumatoidea juvenil, se observó que la variante C producía menos IL-6 que la variante G, proponiendo así la existencia de un genotipo de protección contra el inicio sistémico de esta enfermedad (26).

Múltiples estudios han sido llevados a cabo con la finalidad de evaluar la frecuencia de los polimorfismos del promotor del gen de la IL-6 en distintos grupos étnicos, así como la asociación entre estos polimorfismos, y la presencia y características de diferentes enfermedades. Con respecto al desarrollo de patologías crónicas, se observaron asociaciones entre la presencia del alelo G y la existencia de procesos inflamatorios, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2 y obesidad, cuadros caracterizados por altos niveles de IL-6 (26-30).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el polimorfismo del promotor del gen de la IL-6 y su interacción con los parámetros ferrocinéticos, las alteraciones metabólicas, los marcadores de inflamación y los factores de riesgo y biomarcadores de ECV en pacientes con SH primaria y controles.

2. Materiales y Métodos.

2.1. Diseño del estudio.

Estudio transversal en pacientes con SH primaria y sujetos controles de sexo masculino.

2.2. Sujetos.

Se estudiaron 37 pacientes con SH primaria provenientes del Servicio (*lugar no mencionado para mantener el anonimato del trabajo*) y 37 sujetos controles. Todos los participantes del estudio fueron adultos (> 20 años) de sexo masculino. Para el diagnóstico de SH primaria, se utilizó la técnica *gold standard*, la cual implica la visualización directa de un aumento de los depósitos de hierro con distribución hepatocelular en una muestra de tejido obtenida en la biopsia hepática. Además, los pacientes con SH presentaron alteraciones en los parámetros ferrocinéticos [saturación de transferrina (Tf) > 50 % o concentración sérica de ferritina > 300 ng/ml]. Se excluyeron del estudio aquellos pacientes que presentaban: a) diagnóstico previo de diabetes, b) hepatitis virales agudas o crónicas, c) serología positiva para HIV, d) neoplasias, e) enfermedades tiroideas o renales, f) cirrosis, g) cualquier enfermedad para la que se encontrase contraindicado el tratamiento por flebotomía, h) cáncer, i) consumo excesivo de tabaco (> 10 cigarrillos/día) o alcohol (>40 g/día), y j) tratamiento con beta-bloqueantes, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, diuréticos tiazídicos, antioxidantes, u otras drogas que pudiesen afectar el metabolismo glucídico o lipídico.También, se incluyeron sujetos sanos voluntarios como grupo control. El responsable médico fue (*nombre no mencionado para mantener el anonimato del trabajo*). Se obtuvo el consentimiento

informado escrito de todos los individuos ingresados al estudio. El presente proyecto fue aprobado por 2 Comités de Ética (*nombres no mencionados para mantener el anonimato del trabajo*).

2.3. Protocolo de estudio y muestras.

Se extrajo sangre de la vena antecubital entre las 08:00 y 11:00 hs, luego de 12 horas de ayuno. Las mismas fueron colocadas en tubos secos y con Na_2EDTA. Para la obtención de suero y plasma, los tubos fueron centrifugados a 3.500 rpm durante 15 minutos a 4º C. Se guardaron alícuotas a 4º C para las determinaciones bioquímicas generales que fueron realizadas en un período menor a 24 horas, y a –70º C para la evaluación de los otros parámetros estudiados. Asimismo, se empleó sangre entera anticoagulada con NA_2EDTA para la determinación del hemograma, la genotipificación del gen HFE y la evaluación del SNP -174 G/C del promotor del gen de la IL-6.

2.4. Características clínicas.

En todos los pacientes, se evaluaron signos y síntomas típicos de la patología en estudio. Tanto a los pacientes como a los controles, se les efectuó una anamnesis exhaustiva y se les midió el peso y la altura con prendas livianas y sin calzado. Se calculó el índice de masa corporal (IMC) como el peso / altura^2. También, se midió la circunferencia de la cintura a nivel de la zona umbilical con una cinta métrica no flexible. La presión arterial diastólica y sistólica fue medida en 3 oportunidades luego de 5 minutos de reposo con un esfigmomanómetro certificado (Welch-Allyn, NY, EEUU), desinflado a un ritmo de 2 mm/Hg por segundo. Se consideró válido el promedio de las dos últimas determinaciones.

2.5. Determinaciones bioquímicas generales.

Se analizó el hemograma completo en un autoanalizador Coulter GEN S® (BeckmanCoulter, Fullerton, CA, EEUU). Se midieron las concentraciones de Tf, apo A-I y apo B por inmunonefelometría (IMMAGE®, BeckmanCoulter, Fullerton, CA, EEUU) y la concentración sérica de ferritina mediante un ensayo automatizado de electroquimioluminiscencia (VITROS® ECiQ, Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan City, NJ, EEUU). Se determinaron los niveles de hierro, glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, triglicéridos (TG), colesterol total (TC) y el hepatograma completo por métodos estandarizados (Wiener lab Group, Rosario, Argentina). La saturación de Tf se determinó por cálculo. Se midió la concentración de insulina por un radioinmunoensayo (RIA) comercial (DPC, Los Ángeles, CA, EEUU). Se determinó el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) aisladas en el sobrenadante obtenido luego de la precipitación selectiva de las lipoproteínas con apoproteína (apo) B utilizando reactivo precipitante 0,44 mmol/l ácido fosfotúngstico en presencia de iones magnesio (Wiener lab Group, Rosario, Argentina). Se evaluó el nivel de C-LDL como la diferencia entre el CT y el colesterol contenido en el sobrenadante obtenido después de la precipitación selectiva de LDL con 10 g/l polivinil sulfato en polietilenglicol (600 Da; 2,5% P/V; pH 6,7) (Wiener lab Group, Rosario, Argentina).

2.6. Marcadores de inflamación.

La concentración de PCRus se midió por un ensayo inmunoturbidimétrico ultrasensible (Wiener lab Group, Rosario, Argentina) y los niveles de IL-6 por método de enzimoinmunoensayo (ELISA) empleando un kit comercial que utiliza anticuerpos monoclonales específicos para IL-6 humana (eBioscience, CA, EEUU). Todas las

muestras de los pacientes y controles fueron evaluadas en un solo ensayo con la finalidad de evitar la variabilidad interensayo.

2.7. Hepcidina.

La concentración de hepcidina fue medida en todas las muestras provenientes de los pacientes por cromatografía líquida con detector de espectrometría de masa en tándem (ACQUITY UPLC System, Xevo TQ-MS, Waters, MA, EEUU). Para la extracción y concentración de la hepcidina a partir del suero, se empleó un equipo comercial (Hepcidin 25 LC-MS/MS Kit, Inmunodiagnostik, MA, EEUU).

2.8. Genotipificación del gen HFE.

En los pacientes con SH, a partir de sangre entera periférica, se purificó ADN genómico por el método bromuro de cetil-trimetilamonio (CTAB) (31). La genotipificación se llevó a cabo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa y análisis de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) (8). La reacción de amplificación se realizó con un volumen final de 25 µl usando la siguiente mezcla: 4,5 µl de buffer 10X (Promega, CA, EEUU), 2,2 µl de dNTPs (Promega, CA, EEUU), 0,4 µl de *primers* (Invitrogen, NY, EEUU), 1,2 µl de ADN TaqPolimerasa (Promega, CA, EEUU), 10,7 µl de agua Milli-Q, y 6 µl de ADN genómico. Los *primers* utilizados contra los exones 2 y 4 del gen HFE fueron: para C282Y, *forward* 5-TGGCAAGGGTAAACAGATCC-3 y *reverse* 5-CTCAGGCACTCCTCTCAACC-3; y para H63D, *forward* 5-ACATGGTTAAGGCCTGTTGC-3 y *reverse* 5-GCCACATCTGGCTTGAAATT-3 (33). El ciclado (Axygen® MaxyGene™ II ThermalCycler, CA, EEUU) consistió en una desnaturalización inicial a 95° C durante 5 minutos y en 30 ciclos de desnaturalización

a 95° C durante 30 segundos, *annealing* a 58° C durante 30 segundos, y elongación a 72° C durante 1 minuto. El producto amplificado de la PCR presentó dos sitios de corte con el empleo de las enzimas Rsa I (mutación C282Y, Promega, WI, EEUU) y Bcl I (mutación H63D, Promega, WI, EEUU). Los productos de la digestión se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 3 % P/V durante 1 hora, luego se tiñó el gel con bromuro de etidio y se visualizó con un transiluminador UV. El genotipo fue asignado acorde a los patrones de corte observados.

2.9. Genotipificación del SNP -174 G/C del promotor del gen de la IL-6.

A partir de sangre entera periférica, se purificó ADN genómico por el método CTAB (31). El SNP -174 G/C del promotor del gen de la IL-6 se genotipificó por PCR-RFLP con el empleo de un termociclador Axygen® MaxyGene™ II (CA, EEUU). La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 15 µl conteniendo: 500 ng de ADN genómico, 3 µl de buffer 5X (Promega, CA, EEUU), 200 µM de dNTPs (Promega, CA, EEUU), 10 pmoles de cada *primer* (Invitrogen, NY, EEUU), 1 U de GoTaqPolimerasa (Promega, CA, EEUU), y agua destilada. Se diseñó un juego de *primers* específicos para la secuencia del SNP -174 G/C del promotor del gen de la IL-6: *forward* 5'-TGAAGTAACTGCACGAAATTTGAGG-3' y *reverse* 5'-TGCAATGTGACGTCCTTTAGCAT-3' (32). El ciclado consistió en una desnaturalización inicial a 94° C durante 3 minutos y en 30 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 1 minuto, *annealing* a 50° C durante 30 minutos, y elongación a 72° C durante 1 minuto con una extensión final de 10 minutos a 72° C. El alelo G presenta un sitio de corte para la enzima SfaNI (30). La digestión se realizó en un volumen total de 15 µl que contenía 1,5 µl de buffer 10X (BioLabs, NE, EEUU), 0,1 U de SfaNI (BioLabs, NE, EEUU), 8,4 µl de agua Milli-Q, y 5 µl de producto de PCR a 37° C *overnight*. Los

productos de la digestión se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % P/V durante 2 horas, luego se tiñó el gel con bromuro de etidio durante 10 minutos y se visualizó con un transiluminador UV.El genotipo fue asignado acorde a los patrones de corte observados.

2.10. Análisis estadístico.

Se analizó la distribución de las distintas variables por el método de Shapiro-Wilks. Las variables con distribución normal fueron expresadas como media±desvío estándar (DE) y las de distribución no paramétrica como mediana (quartilo 1 – quartilo 3). Las frecuencias alélicas y génicas fueron analizadas mediante el test Chi cuadrado (χ^2). Las diferencias entre variables continuas con distribución paramétrica fueron analizadas con el test T de Student para muestras independientes. Cuando las variables presentaron una distribución no paramétrica, las diferencias fueron evaluadas empleando el test U de Mann-Whitney. Las correlaciones simples fueron realizadas por los métodos de Pearson y Spearman, acorde a la distribución de las variables. En los casos en los que se evaluaron diferencias de grupos ajustadas, correlaciones parciales y regresiones lineales, se normalizaron las variables no paramétricas antes de ser incluidas en los análisis. Las diferencias ajustadas fueron analizadas por ANCOVA. Se empleó además análisis de regresión logística múltiple. En todos los casos, las pruebas se consideraron significativas con un $p < 0,05$ en la situación bilateral. Para los análisis estadísticos se utilizaron los programas INFOSTAT (Grupo INFOSTAT, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina) y SPSS 17.0 (IBM, Chicago, Ill, EEUU).

3. Resultados.

En un grupo de 37 pacientes de sexo masculino con SH primaria y en 37 controles pareados por sexo y edad, se evaluaron parámetros bioquímicos generales, indicadores del metabolismo del hierro, perfil de lípidos y lipoproteínas, marcadores del estado inflamatorio, presencia de diferentes mutaciones en el gen HFE y el SNP -174 G/C del promotor gen de la IL-6.

3.1. Parámetros bioquímicos generales y marcadores de inflamación en pacientes con SH y sujetos controles.

Los pacientes con SH presentaron mayor IMC que los controles. Por lo tanto, los análisis subsiguientes fueron realizados ajustando por esta variable. Como era esperado, los marcadores del metabolismo del hierro se encontraron significativamente aumentados en los pacientes con SH respecto a los controles, como así también los marcadores de daño hepático (Tabla I).

De acuerdo al rol del hierro en las alteraciones del hepatograma, la saturación de Tf correlacionó con los niveles de bilirrubina total (r=0,49; p=0,0002) y las actividades de ASAT (r=0,42; p=0,002) y ALAT (r=0,26; p=0,0059), mientras que no hubo correlación con los niveles de ferritina. En general, estas asociaciones evidencian el efecto deletéreo de la SH a nivel hepático.

El perfil de lípidos y lipoproteínas de los pacientes con SH y los sujetos controles se muestra en la tabla II. En comparación con los controles, se observó que los pacientes con SH se caracterizaron por una tendencia hacia valores más altos de TG y más bajos de C-HDL, aunque no se alcanzó significancia estadística. También, se detectó una leve disminución del C-LDL en pacientes con SH.

Además, se observó que los niveles de los marcadores de inflamación crónica, PCRus e IL-6, presentaron diferencias entre pacientes y controles, siendo que la PCRus estaba aumentada (OR=5,56; IC95%=3,93-7,76; p<0,05) y la IL-6 disminuida (OR=1,59; IC95%=0,51-4,95; p<0,05) en pacientes con SH (Figura 1).

3.2. Análisis del gen HFE en pacientes con SH.

Del grupo de pacientes (n=37), 27 (73%) presentaron alguna de las mutaciones evaluadas en el gen HFE. Once de estos 27 pacientes con SH fueron homocigotas y 2 heterocigotas para la mutación C282Y. Por otro lado, 2 pacientes fueron homocigotas y 9 heterocigotas para la mutación H63D del mismo gen, mientras que solo 3 pacientes fueron doble heterocigotas H63D/C282Y y 10 pacientes no presentaron ninguna mutación (Figura 2).

La hepcidina, hormona de crucial importancia en la regulación de la homeostasis del hierro, fue evaluada en el grupo de pacientes con SH. Sus niveles plasmáticos resultaron estar significativamente disminuidos en los portadores de la mutación C282Y con respecto a los que carecían de dicha mutación [21 (16 – 24) *vs*. 34 (19 – 58) ng/ml, respectivamente; p=0,0058].

3.3. Análisis del SNP -174 G/C del promotor del gen de la IL-6 en pacientes con SH y sujetos controles.

La distribución de los genotipos y de los alelos del SNP -174 G/C del promotor del gen de la IL-6 se muestra en la tabla III. Los genotipos del polimorfismo -174 G/C se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg (p=0,17). Las frecuencias genotípicas fueron 43% CC, 43% CG y 14% GG en pacientes con SH, y 10% CC, 41% CG y 49% GG en sujetos controles. Con respecto a la frecuencia alélica, la variante C tuvo una mayor

prevalencia en pacientes con SH en comparación con los sujetos controles (65% *vs.* 30%; OR=4,094, IC95%=2,062-8,128; p<0,0001).

Teniendo en cuenta que la presencia de una determinada variante alélica se podría asociar al desarrollo de la SH, más allá de las características del gen HFE, se realizó un análisis de regresión logística múltiple incluyendo a ésta como variable dependiente. Para el mismo, se tomó como referencia al genotipo ancestral (homocigosis GG). Además de la presencia de homocigosis CC y heterocigosis CG, se incluyeron a las siguientes variables como independientes. ferremia, ferritina, saturación Tf, PCRus e IL-6. Este análisis reveló que la SH se asociaba de manera independiente y significativa principalmente a la presencia de homocigosis CC del polimorfismo de la IL-6 y, en menor grado, a la saturación de Tf y a la ferritina (Tabla IV).

4. Discusión.

Este estudio permitió la descripción de distintas alteraciones metabólicas en el grupo de pacientes con SH primaria en comparación con los controles sanos. Como era esperado, los indicadores del metabolismo del hierro se encontraron alterados en los pacientes, corroborando así el diagnóstico inicial de SH. A su vez, los pacientes mostraron aumento de los niveles plasmáticos de glucosa y de los marcadores de daño hepático, siendo la resistencia insulínica y las alteraciones hepáticas características de las condiciones asociadas a acumulación de hierro (34). Además, en el grupo de pacientes, se observó un estado proinflamatorio caracterizado por un incremento de los niveles de PCRus.

De gran interés resultó el hallazgo de niveles de IL-6 significativamente disminuidos en el grupo de pacientes con SH. La IL-6 es una citoquina pleiotrópica a la cual se le atribuyen características y funciones similares a las hormonas que afectan a la enfermedad vascular, el metabolismo de los lípidos, la resistencia a la insulina, las actividades mitocondriales, el sistema neuroendocrino y el comportamiento neuropsicológico (35). A su vez, es considerada una citoquina proinflamatoria (25), capaz de inducir la síntesis de la PCRus a nivel hepático (36). También, se ha descripto que la IL-6 es quimiotáctica y facilita el crecimiento de células germinales hemopoyéticas, y aumenta la síntesis de IL-2 y de otros mediadores proinflamatorios (37). Además, resulta particularmente interesante para el estudio de las alteraciones del metabolismo del hierro el hecho que la IL-6 induce la expresión de la hepcidina y favorece la acumulación de hierro en los macrófagos (38).

El análisis de los polimorfismos del promotor del gen de la IL-6 en el SNP -174 reveló que de las 2 variantes posibles, C y G, la primera fue más prevalente (65%) en

el grupo de pacientes que la variante G (35%), mientras que en los controles esta relación se hallaba invertida (30% C y 70% G). De hecho, en el grupo de pacientes hubo igual cantidad de sujetos homocigotas CC y heterocigotas CG, siendo significativamente menor el número de individuos GG. Por el contrario, en el grupo de sujetos controles, los homocigotas CC representaron la minoría y el número de individuos heterocigotas CG y homocigotas GG fue similar y significativamente mayor.

El predominio de la presencia del alelo C en el grupo de pacientes con SH explicaría el hallazgo de menores niveles plasmáticos de IL-6 en el grupo de pacientes con respecto a los controles. En primer lugar, en el año 1998, Fishman y col. (26) mostraron que el alelo C producía menos IL-6, atribuyéndole así un rol protector a este alelo frente al desarrollo de artritis reumatoidea juvenil, enfermedad inflamatoria por excelencia. En otro estudio realizado en pacientes con resistencia insulínica, se demostró que individuos homocigotas para el alelo C presentaban concentraciones más bajas de IL-6 con respecto a individuos homocigotas para el alelo G (30). Por otro lado, también se observó que individuos portadores del alelo G tenían mayores niveles plasmáticos de IL-6 (39). Fernández-Real y col. (40) encontraron que individuos con el alelo G poseían mayores niveles de IL-6 asociados a mayores concentraciones de TG totales, TG de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de apo B, además de disminución de C-HDL_2.

En el contexto del estudio del metabolismo del hierro y, en particular, de la SH, cabe destacar que menores niveles de IL-6 se asociarían a elevación de la concentración plasmática de hierro. De hecho, se ha descripto que la IL-6 está involucrada en el mecanismo de regulación de la expresión de la hepcidina, llevada a cabo en el hepatocito a través de la vía de señalización del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3). La unión de la IL-6 a su receptor de membrana

desencadena la fosforilación de los activadores de transcripción de las STAT3, llevada a cabo por la kinasaJanus (JAK). La actividad JAK/STAT3 promueve la dimerización de los activadores STAT3 y su migración al núcleo celular, donde actúan como factores de transcripción nucleares con elevada afinidad por el promotor del gen de la hepcidina (18), activando su expresión (41, 42). La hepcidina actúa a través de la ferroportina, una proteína transmembrana cuya función es permitir la salida de hierro desde las células hacia la circulación. Cuando la hepcidina se une a la ferroportina provoca su internalización y degradación intracelular, con lo que se reduce la capacidad de las células de exportar hierro. Un exceso de hepcidina produce un secuestro de hierro en las células de la mucosa intestinal, así como en los macrófagos, reduciendo la absorción de hierro y la capacidad de los macrófagos de liberar el hierro producto de la eritrofagocitosis (43). El resultado es una disminución del hierro sérico y de la generación de glóbulos rojos en el tejido eritropoyético. En contraste, cuando los niveles de la hormona hepcidina disminuyen, la absorción de hierro, así como sus niveles séricos y la capacidad de reciclaje de hierro aumentan. Por lo tanto, menores niveles de IL-6 se asociarían a disminución de la concentración de hepcidina y éstos, a su vez, a aumento del hierro circulante.

De esta manera, la menor concentración de IL-6 observada en los pacientes con SH, consecuencia de la mayor prevalencia del alelo C del promotor del gen de la IL-6 en el SNP -174, acentuaría la acumulación de hierro circulante característica de los pacientes con SH primaria, cuyo defecto de base sería la presencia de alguna mutación en el gen HFE. Esta asociación fue también sugerida por el análisis de regresión logística múltiple que identificó a la presencia de homocigosis CC, a la saturación de Tf y a los niveles de ferritina como los predictores más potentes de la patología. Con respecto al gen HFE, codifica para una proteína que participa en la vía de señalización

del receptor de Tf-1 y Tf-2, cuya finalidad es aumentar la expresión de hepcidina en respuesta a elevaciones de los niveles de hierro circulante (44). Mutaciones en el gen HFE como ser C282Y y/o H63D, que se encontraban en la mayoría de los pacientes estudiados, afectan la capacidad de respuesta del hepatocito para aumentar la expresión de hepcidina ante aumentos del hierro en circulación. Por lo tanto, los portadores de estas mutaciones se caracterizan por cursar con bajos niveles de hepcidina y SH debido a una absorción desregulada del hierro dietario.

Una limitación del presente estudio consiste en que, si bien se utilizó el método patrón de cromatografía líquida con detector de espectrometría de masa en tándem, los niveles de hepcidina solo fueron medidos en el grupo de pacientes. Además, hasta la actualidad no se cuentan con valores de referencia obtenidos empleando el método antes mencionado. Por lo tanto, no es posible efectuar comparaciones entre los pacientes y los sujetos controles. Sin embargo, resulta interesante el hallazgo de una menor concentración de hepcidina en portadores de la mutación C282Y con respecto a aquellos pacientes que carecían de dicha mutación, corroborando así los mecanismos moleculares antes explicados.

En pacientes con SH primaria, un moderado proceso inflamatorio se suele observar a nivel hepático fundamentalmente durante los estadíos avanzados de la enfermedad junto al desarrollo de fibrosis y cirrosis (45). Deugnier y col. (46) detectaron un infiltrado inflamatorio, linfocítico o histiocítico, en 45% de las biopsias realizadas a pacientes con hemocromatosis hereditaria. En estos pacientes, la inflamación estaba presente principalmente en las regiones portal y periportal, y se correlacionaba con los *scores* histológicos de hierro, los cambios degenerativos de los hepatocitos y la fibrosis hepática. En el estudio de Stal y col. (47), el 27% de las biopsias realizadas a pacientes con hemocromatosis hereditaria no tratada mostraron infiltración por linfocitos CD3+.

Por otro lado, Bridle y col. (48) describieron un aumento de la expresión de interferón gamma en biopsias hepáticas de pacientes con hemocromatosis hereditaria, así como disminución de la expresión de la IL-10, interleuquina con propiedades antiinflamatorias, independientemente de la presencia de fibrosis.

Entre los biomarcadores de inflamación, en el presente estudio, se detectó aumento de los niveles plasmáticos de PCRus en los pacientes con SH en comparación con los sujetos controles. Si bien *a priori* se podía haber especulado que en estos pacientes el proceso inflamatorio podía haber estado asociado también a aumento de IL-6, seguramente la mayor prevalencia del alelo C en el SNP -174 del promotor del gen de la IL-6 fue determinante para que las células inflamatorias manifestasen una capacidad limitada para sintetizar y secretar IL-6.

En conclusión, se podría postular a la tríada “presencia del alelo C” – “bajos niveles de IL-6” – “baja concentración de hepcidina” como factor determinante o amplificador del aumento de hierro en circulación. Esta condición de SH se asociaría a un estado proinflamatorio caracterizado por niveles plasmáticos elevados de PCRus, pero bajos de IL-6.

5. Referencias bibliográficas.

1. Piperno A. Molecular diagnosis of hemochromatosis. Expert Opin Med Diagn. 2013 Mar;7(2):161-77.

2. Piperno A. Classification and diagnosis of iron overload. Haematologica. 1998 May;83(5):447-55.

3. Pietrangelo A, Caleffi A, Corradini E. Non-HFE hepatic iron overload. Semin Liver Dis. 2011 Aug;31(3):302-18.

4. Ortiz Polo I, Paredes Arquiola JM, López Serrano A. Moreno-Osset E. Hemocromatosis: etiopatogenia, diagnóstico y estrategia terapéutica. Medicine. 2012;19:1153-61.

5. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. Gastroenterology. 2010 Aug;139(2):393-408.

6. De Domenico I, Ward DM, Langelier C, Vaughn MB, Nemeth E, Sundquist WI, et al. The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. Mol Biol Cell. 2007 Jul;18(7):2569-78.

7. Adams P, Barton JC, McLaren GD, Acton RT, Speechley M, McLaren CE, et al. Screening for iron overload: lessons from the hemochromatosis and iron overload screening (HEIRS) study. Can J Gastroenterol. 2009 Nov;23(11):769-72.

8. Rey J, Castro M, Lardo M, Ceballo M, Remotti L, Fleischman S, Lazarowski A, Langini, SH. Análisis de las mutaciones del gen HFE relacionadas a hemocromatosis hereditarias en varones del área metropolitana de Buenos Aires. Implicancias en relación con características de la dieta habitual. Revista Bioquímica y Patología Clínica. 2011;75(3):13-7.

9. Fracanzani AL, Piperno A, Valenti L, Fraquelli M, Coletti S, Maraschi A, et al. Hemochromatosis in Italy in the last 30 years: role of genetic and acquired factors. Hepatology. 2010 Feb;51(2):501-10.

10. Sullivan JL. Iron and the sex difference in heart disease risk. Lancet. 1981 Jun 13;1(8233):1293-4.

11. Haidari M, Javadi E, Sanati A, Hajilooi M, Ghanbili J. Association of increased ferritin with premature coronary stenosis in men. Clin Chem. 2001 Sep;47(9):1666-72.

12. Wolff B, Volzke H, Ludemann J, Robinson D, Vogelgesang D, Staudt A, et al. Association between high serum ferritin levels and carotid atherosclerosis in the study of health in Pomerania (SHIP). Stroke. 2004 Feb;35(2):453-7.

13. Friedrich N, Milman N, Volzke H, Linneberg A, Jorgensen T. Is serum ferritin within the reference range a risk predictor of cardiovascular disease? A population-based, long-term study comprising 2874 subjects. Br J Nutr. 2009 Aug;102(4):594-600.

14. Knuiman MW, Divitini ML, Olynyk JK, Cullen DJ, Bartholomew HC. Serum ferritin and cardiovascular disease: a 17-year follow-up study in Busselton, Western Australia. Am J Epidemiol. 2003 Jul 15;158(2):144-9.

15. Gaenzer H, Marschang P, Sturm W, Neumayr G, Vogel W, Patsch J, et al. Association between increased iron stores and impaired endothelial function in patients with hereditary hemochromatosis. J Am Coll Cardiol. 2002 Dec 18;40(12):2189-94.

16. Merono T, Gomez L, Sorroche P, Boero L, Arbelbide J, Brites F. High risk of cardiovascular disease in iron overload patients. Eur J Clin Invest. 2011 May;41(5):479-86.

17. van Tits LJ, Jacobs EM, Swinkels DW, Lemmers HL, van der Vleuten GM, de Graaf J, et al. Non-transferrin-bound iron is associated with plasma level of soluble

intercellular adhesion molecule-1 but not with in vivo low-density lipoprotein oxidation. Atherosclerosis. 2007 Sep;194(1):272-8.

18. van der AD, Rovers MM, Grobbee DE, Marx JJ, Waalen J, Ellervik C, et al. Mutations in the HFE gene and cardiovascular disease risk: an individual patient data meta-analysis of 53 880 subjects. Circ Cardiovasc Genet. 2008 Oct;1(1):43-50.

19. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012 Sep;32(9):2045-51.

20. Tete S, Tripodi D, Rosati M, Conti F, Maccauro G, Saggini A, et al. Endothelial cells, cholesterol, cytokines, and aging. Int J Immunopathol Pharmacol. 2012 Apr-Jun;25(2):355-63.

21. Badimon L, Romero JC, Cubedo J, Borrell-Pages M. Circulating biomarkers. Thromb Res. 2012 Oct;130 Suppl 1:S12-5.

22. Zamani P, Schwartz GG, Olsson AG, Rifai N, Bao W, Libby P, et al. Inflammatory biomarkers, death, and recurrent nonfatal coronary events after an acute coronary syndrome in the MIRACL study. J Am Heart Assoc. 2013 Feb;2(1).

23. Arnett DK, McClelland RL, Bank A, Bluemke DA, Cushman M, Szalai AJ, et al. Biomarkers of inflammation and hemostasis associated with left ventricular mass: The Multiethnic Study of Atherosclerosis (MESA). Int J Mol Epidemiol Genet. 2011;2(4):391-400.

24. Loffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, Stocsits C, Hackermuller J, Kretzschmar AK, et al. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. Blood. 2007 Aug 15;110(4):1330-3.

25. Horn F, Henze C, Heidrich K. Interleukin-6 signal transduction and lymphocyte function. Immunobiology. 2000 Aug;202(2):151-67.

26. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. J Clin Invest. 1998 Oct 1;102(7):1369-76.

27. Maedler K, Dharmadhikari G, Schumann DM, Storling J. Interleukin-targeted therapy for metabolic syndrome and type 2 diabetes. Handb Exp Pharmacol. 2011(203):257-78.

28. Andrews NC. Anemia of inflammation: the cytokine-hepcidin link. J Clin Invest. 2004 May;113(9):1251-3.

29. Riikola A, Sipila K, Kahonen M, Jula A, Nieminen MS, Moilanen L, et al. Interleukin-6 promoter polymorphism and cardiovascular risk factors: the Health 2000 Survey. Atherosclerosis. 2009 Dec;207(2):466-70.

30. Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, Gutierrez C, Casamitjana R, Pugeat M, et al. Interleukin-6 gene polymorphism and insulin sensitivity. Diabetes. 2000 Mar;49(3):517-20.

31. Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 1980 Oct 10;8(19):4321-5.

32. Muller-Steinhardt M, Schulte F, Kluter H, Bugert P. Optimized PCR with sequence specific primers (PCR-SSP) for fast and efficient determination of Interleukin-6 Promoter -597/-572/-174Haplotypes. BMC Res Notes. 2009;2:245.

33. Pozzato G, Zorat F, Nascimben F, Gregorutti M, Comar C, Baracetti S, et al. Haemochromatosis gene mutations in a clustered Italian population: evidence of high prevalence in people of Celtic ancestry. Eur J Hum Genet. 2001 Jun;9(6):445-51.

34. Brudevold R, Hole T, Hammerstrom J. Hyperferritinemia is associated with insulin resistance and fatty liver in patients without iron overload. PLoS One. 2008;3(10).

35. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. Nat Immunol. 2015 May;16(5):448-57.

36. Fernandez-Real JM, Vayreda M, Richart C, Gutierrez C, Broch M, Vendrell J, et al. Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. J Clin Endocrinol Metab. 2001 Mar;86(3):1154-9.

37. Ramsay AJ, Husband AJ, Ramshaw IA, Bao S, Matthaei KI, Koehler G, et al. The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. Science. 1994 Apr 22;264(5158):561-3.

38. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. N Engl J Med. 2005 Mar 10;352(10):1011-23.

39. Illig T, Bongardt F, Schopfer A, Muller-Scholze S, Rathmann W, Koenig W, et al. Significant association of the interleukin-6 gene polymorphisms C-174G and A-598G with type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab. 2004 Oct;89(10):5053-8.

40. Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, Richart C, Ricart W. Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. J Clin Endocrinol Metab. 2000 Mar;85(3):1334-9.

41. Paez MC, Cioccia AM, Hevia P. Papel de la hepcidina y la ferroportina en la regulación hormonal de la homeostasis del hierro. Acad Biom Dig. 2014;59(62):1-21.

42. Pietrangelo A, Dierssen U, Valli L, Garuti C, Rump A, Corradini E, et al. STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin in vivo. Gastroenterology. 2007 Jan;132(1):294-300.

43. Altes Hernandez A, Aranalde Forto J. [Role of hepcidin in the pathogenesis of hemochromatosis]. Gastroenterol Hepatol. 2009 Nov;32(9):622-6.

44. Burke W, Thomson E, Khoury MJ, McDonnell SM, Press N, Adams PC, et al. Hereditary hemochromatosis: gene discovery and its implications for population-based screening. JAMA. 1998 Jul 8;280(2):172-8.

45. Hubscher SG. Iron overload, inflammation and fibrosis in genetic haemochromatosis. J Hepatol. 2003 Apr;38(4):521-5.

46. Deugnier YM, Loreal O, Turlin B, Guyader D, Jouanolle H, Moirand R, et al. Liver pathology in genetic hemochromatosis: a review of 135 homozygous cases and their bioclinical correlations. Gastroenterology. 1992 Jun;102(6):2050-9.

47. Stal P, Broome U, Scheynius A, Befrits R, Hultcrantz R. Kupffer cell iron overload induces intercellular adhesion molecule-1 expression on hepatocytes in genetic hemochromatosis. Hepatology. 1995 May;21(5):1308-16.

48. Bridle KR, Crawford DH, Fletcher LM, Smith JL, Powell LW, Ramm GA. Evidence for a sub-morphological inflammatory process in the liver in haemochromatosis. J Hepatol. 2003 Apr;38(4):426-33.

6. Leyendas.

Figura 1: Concentraciones plasmáticas de PCRus (Panel A) e IL-6 (Panel B) en pacientes con SH (n=37) y sujetos controles (n=37). PCRus, proteína C reactiva ultrasensible; IL, interleuquina; SH, sobrecarga de hierro. * $p<0,05$ *vs*. controles.

Figura 2: Distribución de las mutaciones del gen HFE en los 37 pacientes con SH. SH, sobrecarga de hierro. Wt, *wild type*.

Tabla I: Características clínicas y bioquímicas generales de los pacientes con SH y los sujetos controles.

	Pacientes con SH (n=37)	Sujetos controles (n=37)	p
Edad (años)	50 (35 – 61)	46 (35 – 55)	NS
IMC (Kg/m^2)	28,2±3,2	23,1±2,4	<0,0001
Glucosa (mg/dl)	99±14	89±8	<0,005
Acido úrico (mg/dl)	5,9±0,7	5,5±0,9	NS
Gr (10^{3}cél/ml)	5,0±0,3	5,0±0,5	NS
Gb (10^{3}cél/ml)	7±2	7±2	NS
Hematocrito (%)	45 (43 – 47)	45 (43 – 46)	NS
Plaquetas (10^{3}cel/ml)	202±75	225±37	NS
Ferremia (ug/dl)	141 (105 – 176)	86 (73 – 111)	<0,0001
Saturación Tf (%)	47 (33 – 65)	26 (24 – 31)	<0,0001
Ferritina (ng/ml)	246 (68 – 558)	86 (61 – 166)	<0,05
ASAT (IU/l)	29 (23 – 39)	21 (17 – 23)	<0,0001
ALAT (IU/l)	38 (23 – 49)	19 (18 – 26)	<0,0005
FAL (IU/l)	68 (55 – 87)	63 (49 – 74)	NS
Bilirrubina (mg/dl)	0,9 (0,6 – 1,0)	0,6 (0,6 – 0,9)	NS

SH, sobrecarga de hierro; IMC, índice de masa corporal; Gr, glóbulos rojos; Gb, glóbulos blancos; Tf, transferrina; ASAT, aspartatoaminotransferasa; ALAT, alaninaaminotransferasa; FAL, fosfatasa alcalina; NS, no significativo. Los resultados están expresados como media±desvió estándar (DE) o mediana (Q1-Q3) para variables con distribución paramétrica y no paramétrica, respectivamente.

Tabla II: Perfil de lípidos y lipoproteínas de los pacientes con SH y los sujetos controles.

	Pacientes con SH (n=37)	Sujetos controles (n=37)	p
TG (mg/dl)	97 (78 – 147)	88 (70 – 117)	NS
CT (mg/dl)	176±35	191±29	<0,05
C-VLDL (mg/dl)	18 (16 – 26)	19 (16 – 22)	NS
C-LDL (mg/dl)	109±31	123±27	<0,05
C-HDL (mg/dl)	45±10	48±10	NS
CT/ C-HDL	3,8 (3,3 – 5,0)	4,1 (3,3 – 5,0)	NS
Apo B (mg/dl)	85±26	93±18	NS
Apo A-I (mg/dl)	130±19	137±20	NS

SH, sobrecarga de hierro; TG, triglicéridos; CT, colesterol total; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad; apo, apolipoproteína; NS, no significativo. Los resultados están expresados como media±desvío estándar (DE) o mediana (Q1-Q3) para variables con distribución paramétrica y no paramétrica, respectivamente.

Tabla III: Resultados de la genotipificación por PCR-RFLP del SNP -174 G/C del promotor del gen de la IL-6 en pacientes con SH y sujetos controles.

Genotipos	Pacientes con SH (n=37)	Sujetos controles (n=37)	X^2	p
CC	16	4	14,58	0,0007*
CG	16	15		
GG	5	18		
Alelo C	48 (65%)	23 (31%)		<0,0001*
Alelo G	26 (35%)	51 (69%)		

PCR-RFLP, reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción; IL, interleuquina; SH, sobrecarga de hierro.

*Distribución analizada por la prueba de X^2 (95%).

Tabla IV: Análisis de regresión logística múltiple empleando a la presencia de SH como variable dependiente en la población estudiada.

Variables	B	D.E.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Homocigosis CC	3,114	1,367	5,189	1	0,023	22,517
SaturacionTf	0,093	0,046	4,073	1	0,044	1,098
Ferritina	0,008	0,004	4,957	1	0,026	1,008
Constante	-7,493	2,525	8,810	1	0,003	0,001

SH, sobrecarga de hierro; B, coeficiente de B; D.E., desvío estándar; Wald, estadístico de Wald; gl, grados de libertad; Exp(B), estimación de *OddsRatio;* Tf, transferrina. Las variables incluidas en el modelo como independientes fueron: homocigosis CC, heterocigosis CG, interleuquina-6, proteína C reactiva ultrasensible, ferremia, ferritina, y saturación Tf.

Figura 1

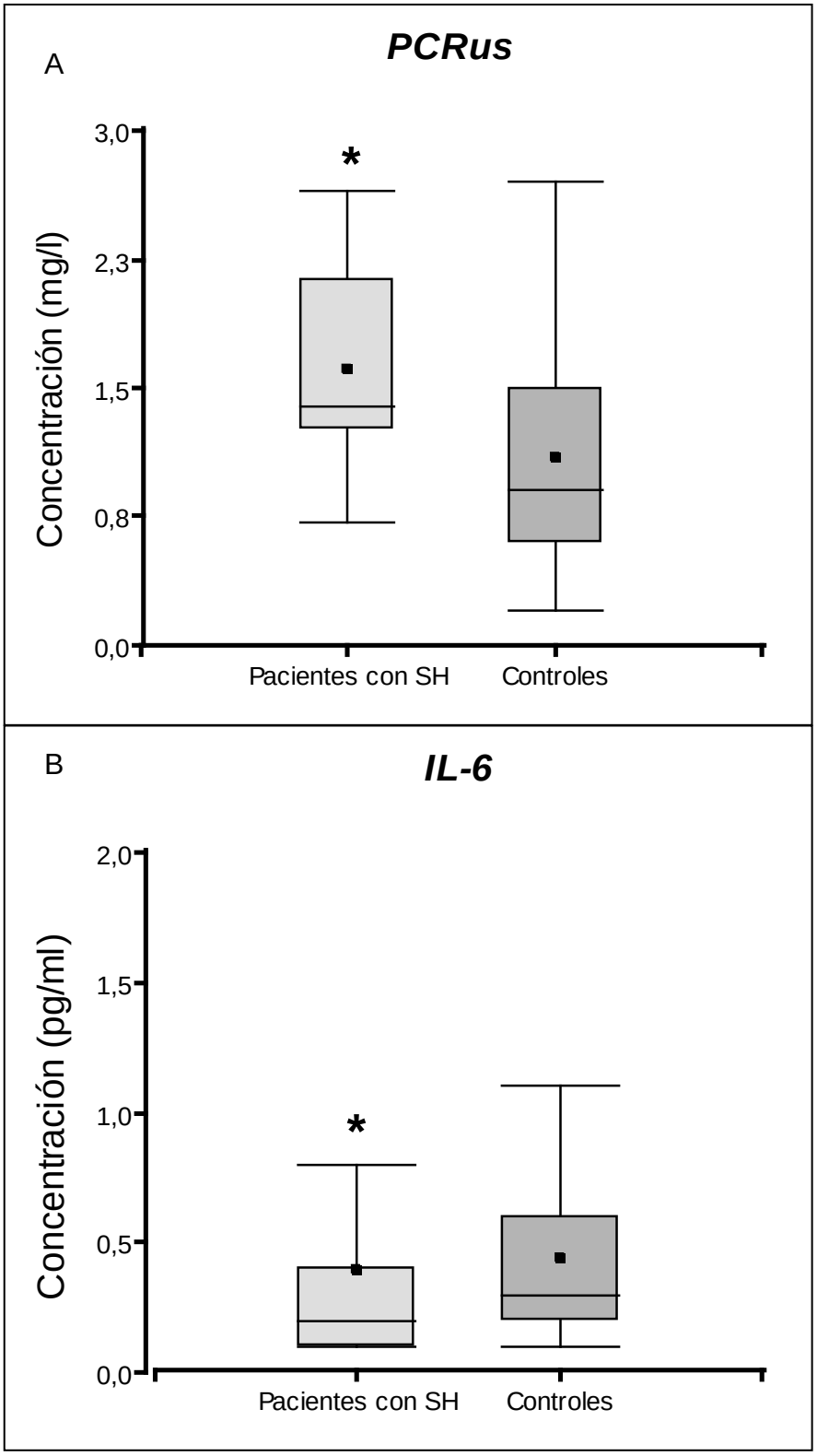
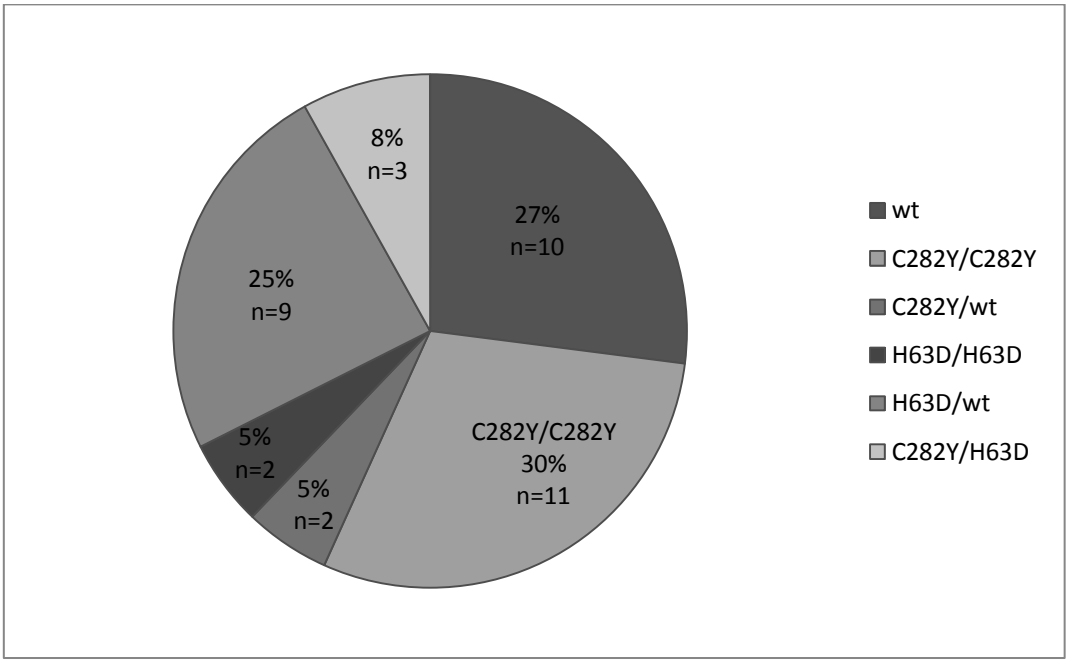

A
PCRus
Concentración (mg/l)
3,0
2,3
1,5
0,8
0,0
*
Pacientes con SH
Controles
B
IL-6
Concentración (pg/ml)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
*
Pacientes con SH
Controles

Figura 2


8%
n=3
27%
n=10
25%
n=9
5%
n=2
5%
n=2
C282Y/C282Y
30%
n=11
wt
C282Y/C282Y
C282Y/wt
H63D/H63D
H63D/wt
C282Y/H63D