

## ARTÍCULO ORIGINAL

# Estudio del polimorfismo del promotor del gen de la IL-6 en pacientes con sobrecarga de hierro primaria

Tetzlaff, Walter Francisco<sup>1\*</sup>; Meroño, Tomás<sup>1</sup>; Sorroche, Patricia<sup>2</sup>; Boero, Laura<sup>1</sup>; Martín, Maximiliano<sup>1</sup>; Botta, Eliana<sup>1</sup>; Castro, Marcelo<sup>3</sup>; Frechtel, Gustavo<sup>4</sup>; Rey, Jorge<sup>3</sup>; Daruich, Jorge<sup>5</sup>; Cerrone, Gloria<sup>4</sup>; Brites, Fernando Daniel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC), Universidad de Buenos Aires (UBA). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup> Laboratorio Central, Hospital Italiano de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

<sup>3</sup> Servicio de Hemoterapia, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Facultad de Medicina, Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC), Universidad de Buenos Aires (UBA). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

<sup>4</sup> Cátedra de Genética y Biología Molecular, Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (UBA). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

<sup>5</sup> Servicio de Gastroenterología, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Universidad de Buenos Aires (UBA). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Contacto:** Walter Francisco Tetzlaff. E-mail: waltertetzlaff@gmail.com

## Resumen

La sobrecarga de hierro (SH) primaria ha sido vinculada a un estado proinflamatorio y a mayor riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV). Entre los marcadores de inflamación asociados a ECV, 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 transcripción. El objetivo de este trabajo fue evaluar el SNP -174 G/C y su interacción con marcadores de inflamación, con factores de riesgo y biomarcadores de ECV en pacientes con SH primaria y controles. Se estudiaron 37 pacientes de sexo masculino con SH primaria en comparación con controles pareados por sexo y edad. Se determinó la concentración de PCRus por inmunoturbidimetría ultrasensible automatizada y la de IL-6 por enzoinmunoensayo. Se evaluó el SNP-174 G/C por PCR-RFLP. Se encontró que la PCRus fue mayor y la IL-6 menor en los pacientes en comparación con los controles. El análisis del polimorfismo del SNP-174 G/C mostró frecuencias genotípicas significativamente diferentes entre pacientes (43% CC, 43% CG y 14% GG) y controles (10% CC, 41% CG y 49% GG) (OR = 4,09, IC 95% = 2,06 - 8,13,  $p < 0,0001$ ), en los que se encontró equilibrio de Hardy-Weinberg. El análisis de regresión logística múltiple reveló, que la SH se asociaba en forma independiente y significativa, a la homocigosis CC (OR: 7,05;  $p < 0,01$ ; IC 95%: 1,66 – 29,86) y luego, a la ferremia. Se concluyó que los pacientes con SH primaria presentaron mayor frecuencia del alelo C en el promotor del gen de la IL-6, lo que condicionaba la presencia de menores niveles 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

Primary iron overload (IO) has been linked to a pro-inflammatory state and to increased risk of cardiovascular disease (CVD). Among the markers of inflammation associated with CVD, high sensitive C-reactive protein (hsCRP) and interleukin 6 (IL-6) are the most relevant. The gene promoter of IL-6 has a single nucleotide polymorphism (SNP) on position -174 (G/C), which regulates its transcription. The aim of this study was to evaluate the SNP -174 G/C and its interaction with risk factors and biomarkers of CVD in patients with primary IO and controls. Thirty-seven men diagnosed with primary IO were studied and compared with sex and age-matched controls. HsCRP concentration was evaluated by automated high sensitive immunoturbidimetric assay and IL-6 by enzyme immunoassay. SNP -174 G/C was evaluated by PCR-RFLP. HsCRP was higher and IL-6 lower in patients compared to controls. The genotyping of the SNP -174 G/C showed significantly different genotype frequencies between patients (43% CC, 43% CG and 14% GG) and controls (10% CC, 41% CG and 49% GG) (OR = 4.09, 95% CI = 2.06 to 8.13,  $p < 0.0001$ ), being in Hardy-Weinberg equilibrium. The multiple logistic regression analysis

ISSN 1515-6761 Ed. Impresa  
ISSN 2250-5903 Ed. CD-ROM  
Código Bibliográfico: RByPC  
Fecha de Recepción:  
04/09/2015.  
Fecha de aceptación:  
18/01/2016

showed that IO was independently and significantly associated, firstly, with the CC homozygosis (OR: 7.05,  $p < 0.01$ ; IC 95%: 1.66 – 29.86) and then with serum iron. It was concluded that patients with primary IO presented higher frequency of the C allele in IL-6 gene promoter, thereby conditioning the presence of lower circulating IL-6. Through its relationship with the expression of hepcidin, decreased IL-6 would deepen 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.

## Introducción

La sobrecarga de hierro primaria abarca un grupo de enfermedades hereditarias<sup>1</sup> que afectan el metabolismo del hierro, provocando su acumulación en distintos órganos y sistemas<sup>2</sup>. En estas condiciones hereditarias, la expresión y/o regulación de proteínas y hormonas relacionadas con el metabolismo del hierro pueden estar afectadas.<sup>1,3</sup>

La causa principal de la SH primaria es la presencia de mutaciones en el gen HFE, las cuales se encuentran presentes en aproximadamente 1 de cada 200 sujetos caucásicos<sup>4</sup>. 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<sup>5</sup>. 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<sup>6</sup>.

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<sup>7</sup>. En contraste, en nuestro país, un estudio de *screening*, que evaluó la presencia de mutaciones en el gen HFE reveló que la mutación H63D era la más prevalente, seguida por las mutaciones S65C y C282Y<sup>8</sup>. Es de notar que hasta el momento no se han descrito diferencias significativas en el curso clínico de la enfermedad entre pacientes con distintos genotipos.<sup>7,9</sup> Alteraciones frecuentes asociadas a SH son las artropatías, la diabetes, la hiperpigmentación y las hepatopatías, entre otras.

A partir del planteo de la hipótesis del hierro-corazón de Sullivan<sup>10</sup>, 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 demostraron 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<sup>11-14</sup>. 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<sup>15-17</sup>. No obstante, un meta análisis reciente no detectó asociación significativa entre la presencia de la mutación C282Y del gen HFE y el riesgo de ECV<sup>18</sup>. 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<sup>19,20</sup>. Por lo tanto, numerosas moléculas propias del proceso inflamatorio son plausibles de ser utilizadas como biomarcadores o factores de riesgo de ECV. Entre ellos, cabe destacar a la interleuquina 6 (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<sup>21,22</sup>. La IL-6 está involucrada en la respuesta sistémica a la inflamación, tanto en el sistema nervioso, como en el hígado y la médula ósea.

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 citocina en la posición -174<sup>23</sup>.

Múltiples estudios 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. Así, 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<sup>23-27</sup>.

Los objetivos del presente estudio fueron evaluar el polimorfismo del promotor del gen de la IL-6 y su interacción con los parámetros ferrocínéticos, 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

### Diseño del estudio

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

### Sujetos

Se estudiaron 37 pacientes con SH primaria provenientes del Servicio de Hepatología, División Gastroenterología, Hos-

pital de Clínicas “José de San Martín”, Universidad de Buenos Aires 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 patrón, la cual implica la visualización directa de un aumento de los depósitos de hierro, con distribución hepatocelular en una muestra de tejido obtenida por punción hepática. Además, los pacientes con SH presentaron alteraciones en los parámetros ferrocinéticos [saturación de transferrina (Tf) > 50 % y 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 que fueron pareados por sexo y edad. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los individuos ingresados al estudio. El presente proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas “José de San Martín” y el Comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

### 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 muestras fueron colocadas en tubos secos. Para la obtención de suero, los tubos fueron centrifugados a 3.500 rpm durante 15 minutos a 4° C. Se guardaron alícuotas a 4° C para las determinaciones bioquímicas generales, que fueron realizadas en un período menor a 24 horas, y a -70° C para la evaluación de los otros parámetros estudiados. Asimismo, se empleó sangre entera anticoagulada con Na<sub>2</sub>EDTA 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.

### 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<sup>2</sup>. También, se midió la circunferencia de la cintura a nivel de la zona umbilical con una cinta métrica no distensible.

### Determinaciones bioquímicas generales

Se analizó el hemograma completo en un autoanalizador Coulter GEN S® (BeckmanCoulter, Fullerton, CA, EEUU). Se midieron las concentraciones de Tf, apoproteína (apo) A-I y apo B por inmunofluorimetría (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<sup>18</sup>, colesterol total (TC) y el hepatograma completo por métodos estandarizados (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). La saturación de Tf se determinó por cálculo. Se midió el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) aisladas en el sobrenadante obtenido luego de la precipitación selectiva de las lipoproteínas con apo B habiendo utilizado como reactivo precipitante 0,44 mmol/l ácido fosfotúngstico en presencia de iones magnesio (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Se evaluó el nivel de colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (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).

### Marcadores de inflamación

La concentración de PCRus se midió por un ensayo inmunoturbidimétrico ultrasensible (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) 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 sólo ensayo con la finalidad de evitar la variabilidad interensayo.

### Genotipificación del gen HFE

En los pacientes con SH, a partir de sangre entera periférica, se purificó el ADN genómico por el método bromuro de cetil-trimetilamonio (CTAB)<sup>28</sup>. La genotipificación se llevó a cabo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa y el análisis de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP)<sup>8</sup>. 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-CTCAGGCACTCTCTCAACC-3; y para H63D, *forward* 5-ACATGGTTAAGGCCTGTTGC-3 y *reverse* 5-GCCACATCTGGCTTGAATT-3<sup>29</sup>.

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 elon-

gación 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.

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

A partir de sangre entera periférica, se purificó el ADN genómico por el método CTAB<sup>28</sup>. 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 GoTaq Polimerasa [Promega, CA, EEUU], y agua destilada. Se diseñó un juego de *primers* específicos que flanquean la secuencia del SNP -174 G/C del promotor del gen de la IL-6: *forward* 5'-TGAAGTAACTGCACGAAATTTGAGG-3' y *reverse* 5'-TGCAATGTGACGTCCTTAGCAT-3'<sup>29</sup>. 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. La presencia del alelo G genera un sitio de corte para la enzima SfaNI<sup>27</sup>. 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.

### 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 [rango intercuartil]. Las frecuencias alélicas y génicas fueron analizadas mediante el test Chi cuadrado ( $\chi^2$ ). 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 dife-

rencias 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 19.0 [IBM, Chicago, Ill, EEUU].

### Resultados

En un grupo de 37 pacientes de sexo masculino con SH primaria y en 37 controles pareados por sexo y edad [50 (35 - 61) vs. 46 (35 - 55) años, respectivamente;  $p$  no significativo], 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 del gen de la IL-6.

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

Los pacientes con SH presentaron mayor IMC que los controles [28,2 ± 3,2 vs. 23,1 ± 2,4 kg/m<sup>2</sup>, respectivamente;  $p < 0,0001$ ]. Por tal motivo, 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,

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

	Pacientes con SH (n = 37)	Sujetos controles (n = 37)	p
Gr (10 <sup>3</sup> cél/ml)	5,0 ± 0,3	5,0 ± 0,5	NS
Gb (10 <sup>3</sup> cél/ml)	7 ± 2	7 ± 2	NS
Hematocrito (%)	45 (43 - 47)	45 (43 - 46)	NS
Hemoglobina (g/dl)	15 (14 - 16)	16 (15 - 16)	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 (UI/l)	29 (23 - 39)	21 (17 - 23)	<0,0001
ALAT (UI/l)	38 (23 - 49)	19 (18 - 26)	<0,0005
FAL (UI/l)	68 (55 - 87)	63 (49 - 74)	NS
Bilirrubina Total (mg/dl)	0,9 (0,6 - 1,0)	0,6 (0,6 - 0,9)	NS

► SH, sobrecarga de hierro; Gr, glóbulos rojos; Gb, glóbulos blancos; Tf, transferrina; ASAT, aspartatoaminotransferasa; ALAT, alaninaaminotransferasa; FAL, fosfatasa alcalina; 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. Análisis efectuado mediante el ajuste por índice de masa corporal.

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 ( $r = 0,49$ ;  $p < 0,0005$ ) y las actividades de ASAT ( $r = 0,42$ ;  $p < 0,005$ ) y ALAT ( $r = 0,26$ ;  $p < 0,01$ ). A su vez, también hubo correlación con los niveles de ferritina ( $r = 0,46$ ;  $p < 0,0001$ ).

El perfil de lípidos y lipoproteínas de los pacientes con SH y los sujetos controles se muestra en la tabla II. Sólo, se detectó una leve disminución del colesterol total y 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 los pacientes con SH (Figura 1).

**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 (Figura 2). Once 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 sólo 3 pacientes fueron doble heterocigotas H63D/C282Y. Por último, 10 pacientes no presentaron ninguna mutación (Figura 2).

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

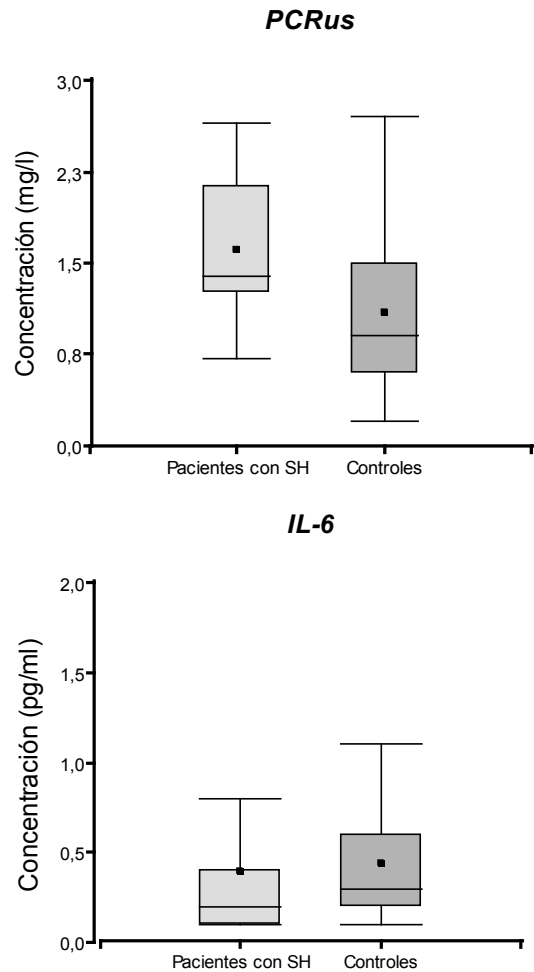
	Pacientes con SH (n = 37)	Sujetos controles (n = 37)	p
TG (mg/dl)	97 (78 – 147)	88 (70 – 117)	NS
CT (mg/dl)	176 ± 35	191 ± 29	< 0,05
C-VLDL (mg/dl)	18 (16 – 26)	19 (16 – 22)	NS
C-LDL (mg/dl)	109 ± 31	123 ± 27	< 0,05
C-HDL (mg/dl)	45 ± 10	48 ± 10	NS
CT/ C-HDL	3,8 (3,3 – 5,0)	4,1 (3,3 – 5,0)	NS
Apo B (mg/dl)	85 ± 26	93 ± 18	NS
Apo A-I (mg/dl)	130 ± 19	137 ± 20	NS
ALAT (UI/l)	38 (23 – 49)	19 (18 – 26)	<0,0005
FAL (UI/l)	68 (55 – 87)	63 (49 – 74)	NS
Bilirrubina Total (mg/dl)	0,9 (0,6 – 1,0)	0,6 (0,6 – 0,9)	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.

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

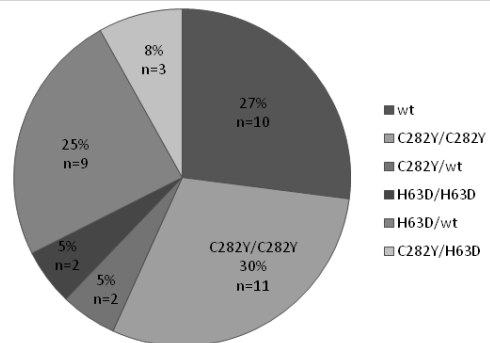
La distribución genotípica y alélica del SNP -174 G/C del promotor del gen de la IL-6 se muestra en la tabla III. Ambas pobla-

**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 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 <sup>2</sup>	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<sup>2</sup> [95%].

ciones se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg para el polimorfismo -174 G/C ( $p = 0,17$ ). 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 ( $p < 0,001$ ). 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 la variante C 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. Tanto la ferritina como la saturación Tf fueron dicotomizadas utilizando los puntos de corte empleados para el diagnóstico de la SH. Este análisis reveló que la SH se asociaba de manera independiente y significativa, principalmente en a la presencia de homocigosis CC del polimorfismo de la IL-6 ( $p < 0,01$ ) y, en menor grado, a la ferremia ( $p < 0,001$ ) [Tabla IV].

## Discusión

En el grupo de pacientes con SH primaria estudiado, se observó predominio del alelo C del gen del promotor de la IL-6, lo cual se asoció a menores niveles plasmáticos de IL-6 en comparación con controles sanos. Más aún, los pacientes presentaron alteraciones de los marcadores del metabolismo del hierro de daño hepático y mayores niveles plasmáticos de PCRus, indicador de inflamación sistémica.

El hallazgo de niveles de IL-6 significativamente disminuidos en el grupo de pacientes con SH resultó de particular interés. 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<sup>30</sup>. También, se ha descrito 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<sup>31</sup>. Además, resulta particularmente interesante para el estudio de las alteraciones del metabolismo del hierro el hecho de que la IL-6 induce la expresión de la hepcidina y favorece la acumulación de hierro en los macrófagos<sup>32</sup>.

El análisis de los polimorfismos del promotor del gen de la IL-6 en el SNP -174 reveló que el alelo C fue más prevalente [65%] en el grupo de pacientes, mientras, que en los controles el alelo G fue el más prevalente [70%]. 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.<sup>23</sup> mostraron que los portadores del alelo C producían menos IL-6, atribuyéndole así un rol protector a este alelo frente al desarrollo de artritis reumatoidea juvenil, enfermedad infla-

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

Variables	B	DE	Wald	gl	p	Exp(B)	IC 95% EXP (B)	
							Inferior	Superior
Homocigosis CC	1,953	0,737	7,026	1	< 0,01	7,047	1,663	29,860
Ferremia	0,034	0,009	14,812	1	< 0,001	1,035	1,017	1,053
Constante	-4,348	1,078	16,269	1	< 0,001	0,013		

► SH, sobrecarga de hierro; B, coeficiente B; DE, desvío estándar; Wald, estadístico de Wald; gl, grados de libertad; Exp(B), estimación de Odds Ratio; IC., intervalo de confianza. Las variables incluidas en el modelo como independientes fueron: homocigosis CC, heterocigosis CG, interleuquina 6, proteína C reactiva ultrasensible, ferremia, ferritina y saturación de transferrina. Tanto la ferritina como la saturación de transferrina fueron dicotomizadas utilizando los puntos de corte empleados para el diagnóstico de la SH.

matoria 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<sup>27</sup>. Por otro lado, también se observó que individuos portadores del alelo G tenían mayores niveles plasmáticos de IL-6<sup>33</sup>. Fernández-Real y col.<sup>34</sup> encontraron que individuos con el alelo G poseían mayores niveles de IL-6 asociados a mayores concentraciones de TG, TG de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de disminución de C-HDL<sub>2</sub>.

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 descrito 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 activación de los factores de transcripción JAK/STAT3<sup>18</sup>, activando la expresión de hepcidina.<sup>35,36</sup> Cuando los niveles de la hormona hepcidina son bajos, 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 la disminución de la concentración de hepcidina y éstos, a su vez, a un aumento del hierro circulante.

De esta manera, la menor concentración de IL-6 observada en los pacientes con SH, consecuencia, ésta, de la mayor prevalencia del alelo C del promotor del gen de la IL-6 en el SNP -174, acentuaría el aumento de hierro circulante en 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 la regresión logística múltiple, que identificó a la presencia de homocigosis CC y a la ferremia como predictores significativos de SH.

Entre los biomarcadores de inflamación, en este 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 podría 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 que la presencia del alelo C, responsable de los bajos niveles de IL-6, constituiría un factor predisponente para el aumento del hierro en circulación y para la expresión clínica de la SH. La SH primaria representa un estado proinflamatorio caracterizado por niveles plasmáticos elevados de PCRus, pero bajos de IL-6.

## Agradecimientos

Para la realización del presente estudio se contó con subsidios de la Universidad de Buenos Aires (UBACyT), de CONICET (PIP) y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT).

## Referencias bibliográficas

- Piperno A. Molecular diagnosis of hemochromatosis. *Expert Opin Med Diagn* 2013;7(2):161-177.
- Piperno A. Classification and diagnosis of iron overload. *Haematologica* 1998;83(5):447-455.
- Pietrangelo A, Cleffi A, Corradini E. Non-HFE hepatic iron overload. *Semin Liver Dis*. 2011;31(3):302-318.
- Ortiz Polo I, Paredes Arquiola JM, López Serrano A, Moreno-Osset E. Hemocromatosis: etiopatogenia, diagnóstico y estrategia terapéutica 2012;11(19):1153-1161.
- Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology* 2010;139(2):393-408, e1-2.
- De Domenico I, Ward DM, Langelier C, Vaughn MB, Nemeth E, Sundquist WI. The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol Biol Cell* 2007;18(7):2569-2578.
- Adams P, Barton JC, McLaren GD, Acton RT, Speechley M, McLaren CE. Screening for iron overload: lessons from the hemochromatosis and iron overload screening (HEIRS) study. *Can J Gastroenterol* 2009;23(11):769-772.
- Rey J, Castro M, Lardo MM, Ceballos MF, Remotti L, Fleischman S. Análisis de las mutaciones del gen HFE relacionadas a hemocromatosis hereditaria 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):13-17.
- Fracanzani AL, Piperno A, Valenti L, Fraquelli M, Coletti S, Maraschi A. Hemochromatosis in Italy in the last 30 years: role of genetic and acquired factors. *Hepatology* 2010;51(2):501-510.
- Sullivan JL. Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet* 1981;1(8233):1293-1294.
- Haidari M, Javadi E, Sanati A, Hajilooi M, Ghanbili J. Association of increased ferritin with premature coronary stenosis in men. *Clin Chem* 2001;47(9):1666-1672.
- Wolff B, Volzke H, Ludemann J, Robinson D, Vogelgesang D, Staudt A. Association between high serum ferritin levels and carotid atherosclerosis in the study of health in Pomerania (SHIP). *Stroke* 2004;35(2):453-457.
- 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;102(4):594-600.
- 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;158(2):144-149.
- Gaenger H, Marschang P, Sturm W, Neumayr G, Vogel W, Patsch J. Association between increased iron stores and impaired endothelial function in patients with hereditary hemochromatosis. *J Am Coll Cardiol* 2002;40(12):2189-2194.

16. Meroño T, Gómez L, Sorroche P, Boero L, Arbelbide J, Brites F. High risk of cardiovascular disease in iron overload patients. *Eur J Clin Invest* 2011;41(5):479-486.
17. van Tits LJ, Jacobs EM, Swinkels DW, Lemmers HL, van der Vleuten GM, de Graaf J. 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;194(1):272-278.
18. van der AD, Rovers MM, Grobbee DE, Marx JJ, Waalen J, Ellervik C. Mutations in the HFE gene and cardiovascular disease risk: an individual patient data meta-analysis of 53880 subjects. *Circ Cardiovasc Genet* 2008;1(1):43-50.
19. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(9):2045-2051.
20. Tete S, Tripodi D, Rosati M, Conti F, Maccauro G, Saggini A. Endothelial cells, cholesterol, cytokines, and aging. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2012;25(2):355-363.
21. Löffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, Stocsits C, Hacker-muller J, Kretzschmar AK. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer *Blood* 2007;110(4):1330-1333.
22. Horn F, Henze C, Heidrich K. Interleukin-6 signal transduction and lymphocyte function. *Immunobiology* 2000;202(2):151-167.
23. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S. 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;102(7):1369-1376.
24. Maedler K, Dharmadhikari G, Schumann DM, Storling J. Interleukin-targeted therapy for metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Handb Exp Pharmacol*. 2011(203):257-278.
25. Andrews NC. Anemia of inflammation: the cytokine-hepcidin link. *J Clin Invest* 2004;113(9):1251-1253.
26. Riiikola A, Sipila K, Kahonen M, Jula A, Nieminen MS, Moilanen L. Interleukin-6 promoter polymorphism and cardiovascular risk factors: the Health 2000 Survey. *Atherosclerosis* 2009;207(2):466-470.
27. Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, Gutiérrez C, Casamitjana R, Pugeat M. Interleukin-6 gene polymorphism and insulin sensitivity. *Diabetes* 2000;49(3):517-520.
28. Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 1980;8(19):4321-4325.
29. 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/-174 Haplotypes. *BMC Res Notes* 2009;2:245.
30. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* 2015;16(5):448-457.
31. Ramsay AJ, Husband AJ, Ramshaw IA, Bao S, Matthaei KI, Koehler G. The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. *Science*.1994;264(5158):561-563.
32. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med* 2005;352(10):1011-1023.
33. Illig T, Bongardt F, Schopfer A, Muller-Scholze S, Rathmann W, Koenig W. Significant association of the interleukin-6 gene polymorphisms C-174G and A-598G with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(10):5053-5058.
34. 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;85(3):1334-1339.
35. Páez MC, Cioccia AM, Hevia P. Papel de la hepcidina y la ferroportina en la regulación hormonal de la homeostasis del hierro. [Revisión]. *Academia Biomédica Digital* 2014;59(62):1-21.
36. Pietrangelo A, Dierssen U, Valli L, Garuti C, Rump A, Corradini E. STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin in vivo. *Gastroenterology* 2007;132(1):294-300.
37. Altes Hernández A, Aranalde Forto J. Role of hepcidin in the pathogenesis of hemochromatosis. *Gastroenterol Hepatol* 2009;32(9):622-626.
38. Burke W, Thomson E, Khoury MJ, McDonnell SM, Press N, Adams PC. Hereditary hemochromatosis: gene discovery and its implications for population-based screening. *JAMA* 1998;280(2):172-178.