

ticuloendotelial representan los puntos mayoritarios de movilización de los depósitos de hierro. La ceruloplasmina es necesaria para la liberación de hierro desde los macrófagos y por tanto desempeña un papel importante en el reciclaje del hierro procedente de la fagocitosis de los hematíes senescentes.

Los macrófagos pueden captar hierro directamente desde la transferrina transportándolo a través de la DMT1 e incorporarlo a las ferroproteínas incluyendo su depósito como ferritina.

Transporte del grupo hemo

El grupo hemo alimentario es transportado a nivel duodenal por el HCP1 (*heme carrier protein 1*). Una vez en el interior de la célula el grupo hemo es degradado por la hemo oxigenasa liberando hierro y el pigmento biliverdina. Su expresión es inducida por la hipoxia y su localización depende del estatus férrico. En la deficiencia de hierro el HCP1 se localiza en la membrana apical, mientras que la ingesta de hierro resulta en un movimiento de la proteína desde la membrana al interior del citoplasma. Este transportador también se expresa a nivel hepático.

Los depósitos de hierro, hipoxia y velocidad de eritropoyesis son fenómenos bien conocidos de estimulación de la absorción intestinal del hierro inorgánico pero en cambio conocemos poco acerca de sus efectos en la absorción del hierro hemo. Parece que los cambios en la captación duodenal debidos a cambios en los depósitos son menores que los que afectan a la absorción del hierro inorgánico. Los cambios podrían ser a nivel de regulación postranslacional del HCP1⁵, aunque la naturaleza de este mecanismo no es del todo conocida. La unión entre hepcidina y ferroportina con internalización y degradación de esta última pone de evidencia un mecanismo en el que el incremento de las concentraciones intracelulares de hierro pone en marcha una cascada de episodios que resultan en cambios en la localización subcelular de transportadores de hierro en el enterocito. El hecho de recuperar HCP1 teñido en la membrana apical en ratones deficientes en hierro, 72 h después de administrarles una dosis de hierro oral es consistente con el tiempo que se necesita para el aclaramiento del hierro y la formación de nuevos enterocitos.

Mecanismos de regulación en la homeostasis del hierro

El hierro en los mamíferos es necesario para todas las células. Sus papeles más importantes incluyen transporte y liberación de oxígeno y transferencia enzimática de electrones; sin embargo, un exceso de hierro libre promueve la formación de radicales de oxígeno que dañan los lípidos celulares, proteínas y ácidos nucleicos de forma que la homeostasis normal debe conseguir obtener los beneficios del hierro evitando sus

efectos colaterales. Dado que el sistema metabólico no contempla vías de eliminación, el principal mecanismo para mantener el nivel óptimo se centra en un meticuloso control de la absorción intestinal y del hierro contenido en los macrófagos. El conocimiento actual de estos mecanismos ha sido muy importante en los últimos 5 años a consecuencia de los estudios moleculares desarrollados para identificar genes y mecanismos responsables de los cuadros clínicos de hemocromatosis.

La hepcidina va tomando cuerpo desde su primera vinculación con el metabolismo férrico realizada por Pigeon et al⁶ como elemento primordial en la regulación de la homeostasis del hierro. En estudios realizados por Nicolas et al^{7,8} se establece la relación entre presencia deficiente de hepcidina y fenotipo compatible con hemocromatosis en ratones *UDF2 knock-out*. También queda establecida su relación con los mecanismos relacionados con la inflamación en los que aparece aumentada la expresión de hepcidina y relacionando la implicación de la hepcidina en las anemias de proceso crónico.

La función primordial de la hepcidina es la de ser un potente regulador negativo tanto de la absorción intestinal del hierro como de la liberación de éste a partir de macrófagos.

La expresión de ARNm de hepcidina en hígado es incrementada por la sobrecarga férrica y también por las citocinas interleucina-1 (IL-1) e IL-6 y su expresión es frenada por la anemia y la hipoxia⁹.

A partir de ese momento la cuestión a solucionar es como el hígado recibe la señal para estimular o frenar la producción de hepcidina y cómo realiza su función. Dado que la hepcidina responde tanto al estímulo procedente de los depósitos de hierro como de la anemia e hipoxia se postula la existencia de un *sensor* de los depósitos y otro *sensor* de eritropoyesis.

El cómo realiza su función queda resuelto por Nmeth¹⁰ que demuestra que la ferroportina es el receptor de la hepcidina, provocando ésta la internalización celular de la ferroportina y su posterior degradación y de esta forma impidiendo el paso del hierro intestinal al plasma y la expulsión del hierro contenido en los macrófagos.

En el año 2004 el descubrimiento de un nuevo gen el *HJV* que codifica para hemojuvelina¹¹ viene a poner una pieza más en el complicado engranaje que nos ocupa. La hemojuvelina (también conocida como HFE2) tiene como función regular la producción de hepcidina hepática formando parte de la vía que une la cantidad de hierro existente y la hepcidina. Su mutación causa hemocromatosis juvenil y cursa con niveles de hepcidina urinaria bajos. La forma de hemojuvelina intacta es un regulador positivo de la transcripción de hepcidina, mientras que la forma soluble en plasma es un regulador negativo. La forma como realiza la regulación podría ser a través de otra proteína la BMP (*bone morphogenetic protein*) que cuando la hemojuvelina es defectuosa disminuye su señal, disminuyendo a su vez la expresión de hepcidina¹².

La HFE, primera proteína descrita como causante de hemocromatosis se une a la β_2 microglobulina y de

esta forma es transportada a la superficie celular donde interactúa con TFR1.

A partir de este momento quedan fijadas las piezas clave que gestionan el metabolismo del hierro. En cuanto a genes: *HFE*¹⁵, *HJV*¹¹, *HAMP*¹⁴, *SCL40A1*¹⁵, *TFR2*¹⁶ y *DMT1* que nos codifican HFE, hemojuvelina, hepcidina, ferroportina, receptor 2 de la transferrina y el transportador 1 de metales divalentes.

El punto de discusión fundamental a partir de este momento es dónde se localizan los sensores del hierro para el estímulo y la retroalimentación de este complejo sistema tanto el *sensor* eritroide como el *sensor* de depósitos.

En estudios¹⁷ con pacientes con diferentes síndromes clínicos como atranferrinemia, síndromes talasémicos, diseritropoyesis congénita y anemias sideroblásticas, la señal eritroidea de estímulo prevalece sobre la señal de inhibición de los depósitos y en estos casos la absorción de hierro está inapropiadamente estimulada a pesar de la sobrecarga masiva. La señal de necesidad de hierro (anemia/hipoxia) es de mayor rango respecto a la de acumulación en depósitos. Analizada la hepcidina urinaria en estos pacientes se aprecia una no correlación con las cifras de ferritina sérica con disminución e incluso ausencia de hepcidina urinaria. En todos los casos de sobrecarga férrica, excepto en pacientes con enfermedad por defecto en la ferroportina en que la hepcidina urinaria aparece aumentada, se observa frenación de la hepcidina que conduce a una no frenación de la absorción de hierro que a su vez conduce a la retención de este elemento en hígado y bazo y posterior acumulación en otros tejidos diferentes, apareciendo afectación de corazón y frecuentes endocrinopatías en pacientes con talasemia mayor (ver tabla 1).

Estudios concordantes demuestran que los productos génicos *HFE*, *TFR2* y *HJV* son necesarios para que la producción de *HAMP* concuerde con los depósitos de hierro. De hecho tanto la expresión de ARNm *HAMP* en hígado, como los ensayos de *HAMP* en orina han demostrado ser inadecuados (bajos o muy bajos) en relación con el fenotipo de sobrecarga férrica tanto en modelos genéticos de ratones como en pacientes homocigotos para las mutaciones *HFE*, *TFR2* y *HJV*. Se necesitan más estudios para clarificar estas observaciones, pero teniendo en cuenta la común expresión de estas proteínas en hepatocitos, se podría postular que *HFE*, *TFR2* y hemojuvelina actúan como moduladores de la transcripción de *HAMP* en respuesta al hierro y de esta manera las 4 proteínas están implica-

das en una vía común. Esta hipótesis no excluye la existencia de funciones independientes de cada una de las proteínas implicadas, pero establece una base fisiológica que explica la existencia de modelos digénicos en la hemocromatosis como *HFE/TFR2* o *HFE/HAMP* así como los efectos que se producen por la presencia de mutaciones heterocigotas en una de las dos hemocromatosis juveniles en pacientes que son homocigotos para la mutación *HFE* C282Y.

TRF2 actuaría como sensor hepático del hierro circulante y de esta forma tendría un papel importante en la expresión de *HAMP*. Por otro lado *HAMP* regula negativamente al transportador ferroportina en la superficie celular.

La proteína *HFE* primero confinada a tener un papel represivo en la vía de captación de hierro a través de transferrina-transferrina receptor, actualmente se contempla su función como sensor en las criptas duodenales y finalmente un papel claramente centrado en la participación en los mecanismos de regulación en el hepatocito y macrófago.

Por último hacer mención de las proteínas citoplasmáticas *IRP1* y *IRP2* (*iron regulatory proteins*) que se constituyen en proteínas intracelulares reguladoras del metabolismo del hierro, las cuales en respuesta a fluctuaciones en el *pool* celular de hierro, controlan postranscripción la expresión de proteínas ligadas a la captura del hierro y al almacenamiento de éste como son el *TRF* y la ferritina. Cuando el hierro intracelular es bajo, *IRP1* y *IRP2* se unen a los *IRE* (*iron responsive elements*) en la región de transcripción, estabilizando el ARNm de la *TRF* mientras disminuyen la translación del ARNm de la ferritina, aumentando así la disponibilidad de hierro celular. Lo contrario ocurre cuando los depósitos celulares de hierro son altos, la afinidad del *IRP1* y *IRP2* por los *IRE* disminuye, la traslación del ARNm de ferritina aumenta y la estabilidad del ARNm de la *TFR* se reduce, previniendo de esta manera la formación intracelular de un exceso de hierro potencialmente tóxico.

En monocitos/macrófagos y también en células duodenales de pacientes con HH se demuestra una regulación positiva defectuosa de la actividad total *IRP* que demuestra que estas células sufren paradójicamente una situación de "déficit de hierro" en sujetos con sobrecarga de este metal. En pacientes con HH la disfunción en la degradación de ferroportina por hepcidina puede provocar el aumento de la exportación de hierro desde las células intestinales y desde macrófagos conduciendo a una deficiencia de hierro intracelular. Esta reducción del *pool* de hierro que también puede ser causado por la interrupción de la función normal de los complejos *TFR-HFE* como se demuestra con la normalización del fenotipo deficiente en hierro de los monocitos en los pacientes HH transfectados con el gen *HFE wild*, parece afectar a las dos *IRP* pero de forma diferente con predominio sobre la activación de los *IRP2*, indicando que este es más sensible a los cambios en las concentraciones de hierro¹⁸.

Estudios realizados en pacientes con HH sobre todo con mutación *HFE*, por otro lado la más prevalente, y en modelos de ratones con sobrecarga de hierro emu-

Tabla 1. Efecto en las concentraciones de hepcidina provocado por diferentes cuadros clínicos

Hemocromatosis mutaciones <i>HFE</i> , <i>TFR2</i> , <i>HAMP/HJV</i>	Hemocromatosis mutación <i>SLC40A1</i> (ferroportina)	Síndromes eritrodisplásicos	Anemia de proceso crónico	Anemia ferropénica
Hepcidina ↓	Hepcidina ↑	Hepcidina ↓	Hepcidina ↑	Hepcidina ↓

lando la afectación en humanos, el hallazgo de expresión mayoritaria de HFE en hígado indica que el mayor papel de HFE es actuar a nivel hepático como parte del mecanismo *sensor* de las necesidades de hierro¹⁹. Faltan estudios que den luz sobre cómo las demandas de hierro eritropoyéticas influyen la absorción de hierro y conocer mejor los mecanismos relacionados con la vía del transporte del hemo.

Un reciente estudio publicado por Vokurka et al²⁰ y basándose en datos previos disponibles, sugieren que la anemia y probablemente la hipoxia en sí mismas no tienen importancia primaria. Cambios insignificantes en las concentraciones de ARNm de hepcidina se observan en la hemólisis crónica compensada y disminuciones importantes de hepcidina se observan después de la administración de eritropoyetina esta disminución está ausente cuando la médula ósea está suprimida sugiriendo que la actividad eritropoyética y los subsiguientes cambios en el metabolismo del hierro son importantes para la expresión de hepcidina. La saturación de transferrina podría mediar estos cambios. En conclusión un amplio rango de respuestas agudas del ARNm de la hepcidina obedece a cambios en la eritropoyesis y en la movilización del hierro o en la acumulación de hierro en hígado.

En definitiva la hepcidina puede ser vista como una molécula sensible tanto a cambios en la eritropoyesis como en los requerimientos de hierro colocándose en el centro de los procesos ligados al hierro tanto en su almacenamiento como en su disponibilidad para la formación de elementos eritroides en médula ósea.

Métodos de determinación de hepcidina

Es indiscutible la relevancia de la hepcidina en el metabolismo del hierro y en estos momentos serían de gran interés estudios que demuestren su utilidad en la aplicación clínica. En el momento actual no existen kits comerciales disponibles para su determinación y uno de los retos actuales es encontrar un método de laboratorio que pueda utilizarse de forma rutinaria en laboratorios clínicos y pueda ser aplicado a grandes volúmenes de muestras. Los métodos utilizados en las series de investigación son métodos laboriosos que requieren tecnologías no disponibles en laboratorios clínicos y que deben ser utilizados por personal muy experto.

La orina es la muestra más adecuada para la obtención de la hepcidina 25 y sus valores deben ser normalizados por la excreción de creatinina.

Los métodos ensayados hasta la actualidad son:

1. **Immunoblot.** Consiste en la aplicación de extractos urinarios en *blots*, detectando la hepcidina con anticuerpos de conejo dirigidos contra la hepcidina humana. Utilización de un segundo anticuerpo de cabra marcado con peroxidasa y revelado y detección quimioluminiscente con cuantificación por cámara fría.

2. **ELISA** (análisis de inmunoabsorción ligada a enzimas). Existe un método comercial disponible en el mercado que permitiría su utilización en grandes series pero que precisa ser validado clínicamente. Existen dudas respecto a su utilización dado que no queda claro si detecta la molécula entera de la prohepcidina o productos acumulados de las roturas de la molécula de prohepcidina pero en todo caso lo que determina es la molécula funcionalmente activa.
3. **MALDI-TOFF-MS** (*surface enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectrometry*). Esta tecnología se basa en el clásico método de extracción por cromatografía en fase sólida combinada con la detección por espectrometría de masa de ionización/desorción. Este método tiene una alta sensibilidad y es capaz de detectar proteínas en concentraciones del picomol o femtomol, teniendo una alta resolución para proteínas con pesos moleculares de menos de 20 kDa. No obstante sólo está disponible en escasos laboratorios.
4. Continúa abierto a la investigación el encontrar métodos que permitan una amplia implementación de su utilización.

Agradecimientos

Este trabajo está parcialmente financiado por las becas del Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI-04/1120) y de la Agencia d'Avaluació de Tecnologia i Recerca Mèdica (005/29/2004).

Bibliografía

1. Park C, Valore E, Waring A, Ganz T. Hepcidine, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem.* 2001; Suppl 276:7806-10.
2. Krauser A, Neitz S, Mägert H, Schulz A, Forssmann W, Schulz-Knappe P, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 2000;480:147-50.
3. Ganz T. Hepcidine, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood.* 2003;102:783-8.
4. Simovich M, Hainsworth LN, Fields PA, et al. Localization of the iron transport proteins mobilferrin and DMT-1 in the duodenum: the surprising role of mucin. *Am J Hematol.* 2003;74:32-45.
5. Shayeghi M, Latunde-Dada G, Oakhill JS, Takeuchi K, Laftah A, Khan Y, et al. Identification of an Intestinal Heme Transporter. *Cell.* 2005;122:789-801.
6. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidine, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem.* 2001;276:7811-9.
7. Nicolas G, Chauvet C, Viate L, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidine is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest.* 2002;110:1037-44.
8. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:8780-5.
9. Fleming R, Sly W. Hepcidine: A putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and anemia of chronic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:8780-5.

10. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Heparin regulates iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004;306:20990-3.
11. Papanicolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, et al. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*. 2004;36:77-82.
12. Babitt J, Huang F, Wrighting D, Xia Y, Sidis Y, Samad T, et al. Bone morphogenetic protein signalling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet*. 2006;38:531-9.
13. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patient with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet*. 1996;13:399-408.
14. Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidine is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*. 2003;33:21-2.
15. Njajou OT, Vaessen N, Joosse M, et al. A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat Genet*. 2001;28:213-4.
16. Camaschella C, Roetto A, Cali A, et al. Tfr2 gene is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet*. 2000;25:14-5.
17. Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis J, Bogdanos D, Tsimirika K, MacFarlane J, et al. Heparin in iron overload disorders. *Blood*. 2005;105:4103-5.
18. Recalcati S, Alberghini A, Campanella A, Gianelli U, De Camilli U, Conte D, et al. Iron regulatory proteins 1 and 2 human monocytes, macrophages and duodenum: expression and regulation in hereditary hemochromatosis and iron deficiency. *Haematologica*. 2006;91:303-10.
19. Frazer DM, Anderson GJ. The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues? *Blood Cell Molec Dis*. 2003;30:288-97.
20. Vokurka M, Krijij J, Sulc K, Necas E. Heparin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol Res* 2006; feb 23 (Epub ahead of print).

SOBRECARGA FÉRRICA Y MORBIMORTALIDAD DEL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

A. ALTES¹ Y A.F. REMACHA²

¹Departamento de Hematología. Hospital Esperit Sant. Santa Coloma de Gramenet. ²Departamento de Hematología. Hospital Sant Pau. Barcelona.

A pesar de las mejoras conseguidas en el manejo del trasplante hematopoyético (TPH), la morbilidad de este procedimiento todavía es muy elevada. A parte de los problemas derivados de la enfermedad del injerto contra el huésped, la toxicidad en diversos órganos generada por el tratamiento de acondicionamiento y las infecciones secundarias a la inmunosupresión son las causas principales de dicha morbilidad.

El exceso de hierro puede incrementar las complicaciones del TPH por dos mecanismos. Por una parte, la presencia de hierro libre en situación de hipersaturación de la transferrina propicia la catálisis de especies químicas reactivas del oxígeno (radicales libres). Dichos radicales pueden mediar una toxicidad tisular generalizada. Por otra parte el hierro constituye un

elemento esencial para nuestra vida, pero también para la de cualquier bacteria u hongo patógeno. La biodisponibilidad de grandes cantidades de hierro en los pacientes inmunocomprometidos no hace más que propiciar y acelerar la génesis de infecciones oportunistas que pueden causar la muerte del paciente. Abordaremos estos temas dividiendo la cuestión en tres preguntas:

1. ¿Es frecuente la sobrecarga férrica durante el TPH?
2. ¿Aparece hierro libre durante el TPH, con o sin sobrecarga férrica?
3. ¿Existe evidencia clínica de un impacto de las alteraciones férricas sobre la morbilidad del TPH?

¿Es frecuente la sobrecarga férrica durante el TPH?

La importancia de la sobrecarga de hierro presente en pacientes jóvenes, trasplantados por talasemia u otras anemias ligadas a sobrecarga férrica transfusional, está fuera de toda duda y no la consideraremos en este documento. Disponemos de datos más escasos y mucho más confusos en el caso del TPH indicado por enfermedad oncohematológica. La mayoría de estos datos proceden de estudios basados en los niveles de ferritina sérica. Sin embargo, la cuantificación bioquímica del hierro hepático mediante biopsia constituye el test de referencia para valorar los depósitos férricos del paciente¹. Dado que se trata de una prueba cruenta, no exenta de morbilidad, su uso ha sido muy limitado en los pacientes expuestos a TPH (pacientes con importantes problemas en la hemostasia). No obstante se ha analizado esta cuestión en 2 series necrópsicas post-TPH. En la serie de Strasser et al² se analizó el contenido de hierro hepático de 10 pacientes que murieron entre los días 50 y 100 post-TPH alogénico. Todos ellos presentaron concentraciones de hierro hepático correspondientes a los de pacientes afectados de hemocromatosis hereditaria. En dicho estudio se comprobó además la utilidad de la evaluación citológica del hierro en aspirado medular como marcador del hierro corporal. En un estudio posterior, Altés et al³ analizaron el hierro hepático de 59 pacientes procedentes de estudio necrópsico tras trasplante alogénico (24) o autólogo (35). La concentración mediana de hierro hepático fue de 138 µmol/g peso seco, con un índice de hierro hepático superior a 1,9 (criterio mayor de hemocromatosis hereditaria) en 49 pacientes (83 %). No se apreciaron diferencias entre los pacientes autotrasplantados y alotrasplantados. Otros 2 estudios han analizado el problema en pacientes vivos. Azar et al⁴ hallaron sobrecarga de hierro hepática grave en el 76 % de los pacientes biopsiados tras TPH. Miceli et al⁵ han evaluado el hierro corporal en un grupo de 367 pacientes trasplantados por mieloma múltiple. Dicha evaluación no ha seguido cánones ortodoxos, y se ha basado en la evaluación del hierro en médula ósea según el método previamente