

# Efecto de la desferrioxamina (DFO) sobre la proliferación de osteoblastos

C. B. Tzanno-Martins, R. Elorriaga, M. J. Menéndez, M. L. Naves, S. McGregor, V. Jorgetti y J. B. Cannata

Unidad de Investigación. Metabolismo Óseo y Mineral. Hospital Central de Asturias. Universidad de Oviedo. Oviedo. España.  
Departamento de Nefrología. Hospital das Clínicas. Universidades de São Paulo. Brasil.

## Introducción

La desferrioxamina (DFO) es un ácido trihidroxámico capaz de quelar hierro y aluminio y otros iones metálicos trivalentes formando complejos químicos estables. Por esta razón fue introducida, hace más de veinte años, en la práctica clínica, inicialmente para el tratamiento de pacientes con talasemia y hemocromatosis<sup>1</sup>, y más recientemente para el diagnóstico y la terapéutica de los pacientes renales crónicos con intoxicación aluminica.

De hecho, a pesar de ser muy utilizada, la DFO presenta como uno de los principales inconvenientes terapéuticos los efectos tóxicos colaterales, cuya incidencia y gravedad mantienen relación directa con el uso de dosis elevadas, por encima de 70 mg/kg y con estados de deficiencia de hierro<sup>2</sup>.

No obstante, hasta el momento, aún permanece incierta su acción quelante sobre los depósitos intracelulares de hierro y aluminio. Es evidente que la DFO revierte el cuadro clínico sintomático de la intoxicación aluminica y baja los niveles de aluminio presentes en el tejido óseo, mejorando el defecto de calcificación<sup>3</sup>, lo que sugiere un efecto celular. Estudios realizados con cultivos celulares demostraron que la DFO presenta un efecto inhibitorio sobre la proliferación de fibroblastos<sup>4</sup> y linfocitos, posiblemente por la disminución de la actividad enzimática celular dependiente de hierro<sup>5</sup>.

El objetivo central de este trabajo fue analizar el efecto de la DFO en las concentraciones terapéuticas comúnmente utilizadas sobre la proliferación de células óseas, dado que la DFO es utilizada en el tratamiento de pacientes con intoxicación aluminica, que a su vez frecuentemente se asocia con alteraciones en el metabolismo del hierro.

## Material y métodos

Se utilizó la línea celular MG-63 (células de osteosarcoma humano con características de osteoblasto) distribui-

da en frascos de cultivo en medio celular MEM-Earle con 0,85 g/l de bicarbonato de sodio (Seromed), 1 % de L-glutamina (5 mM) y 10 % de suero fetal bovino (SFB), suplementado con 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Incubadas a 37° C en atmósfera con 5 % CO<sub>2</sub> hasta la subconfluencia, tripsinizadas y sembradas en placas de cultivo celular de 96 pocillos (0,25 × 105 células/pocillo) en MEM-Earle con 5 % SFB incubadas en las mismas condiciones ambientales durante 24 horas. Al final del período de preparación, el estudio se realizó en dos fases.

En la primera fase se añadieron disoluciones de DFO (Desferal/Ciba-Geigy) en concentraciones crecientes de 1,0 hasta 100 µM por un período de 24 y 48 horas. En la segunda se cultivaron las células con citrato de hierro 100 µM por 24 horas (control) y con tres concentraciones diferentes de DFO (50, 100 y 200 µM), a las que se añadió citrato de hierro en la misma concentración de 100 µM. La captación de timidina fue medida después de cuatro horas de un marcaje con 1 µCi de H-Thymidine (2,0 Ci/mM Amershan), realizado al final del período de incubación. De cada experimento fueron realizados tres estudios por quintuplicado. El análisis estadístico fue realizado con test t de Student para muestras pareadas.

## Resultados

Fase I: Verificamos una inhibición de la respuesta proliferativa de las células MG-63 a todas las concentraciones de DFO utilizadas cuando fueron incubadas tanto por 24 como por 48 horas con el quelante (p < 0,01), con excepción de las concentraciones de 1,0 y 2,0 µM en los cultivos de 48 horas, donde no hubo diferencia significativa con el control (fig. 1).

Fase II: Cuando se cultivaron las células MG-63 durante 24 horas con citrato de hierro se observó un incremento en la proliferación comparando este grupo con el control (p < 0,01) (fig. 2). En los experimentos realizados incubando simultáneamente las células MG-63 con concentraciones distintas o iguales de citrato de hierro y DFO observamos una anulación del efecto inhibitorio de la DFO en la presencia de adecuadas concentraciones de hierro. Este efecto no se observó cuando la concentración de DFO utilizada fue dos veces mayor que la de citrato de hierro (p < 0,01).

Correspondencia: Dr. J. B. Cannata.  
Unidad de Investigación.  
Metabolismo óseo y mineral.  
Hospital Central de Asturias.  
Oviedo (España).

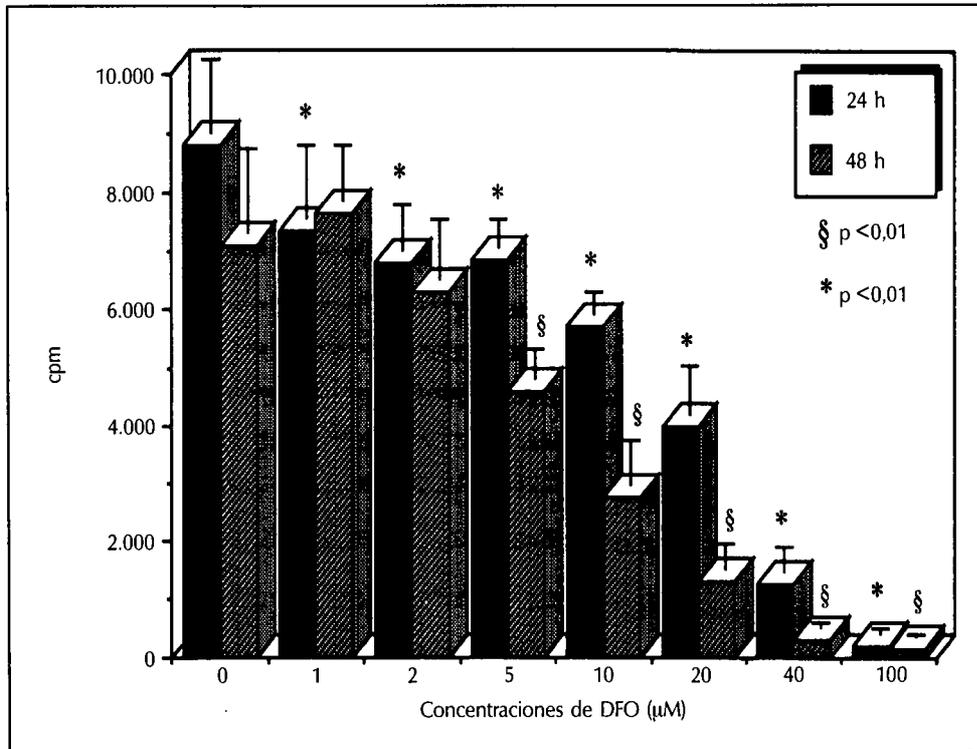


Fig. 1.—Efecto de diferentes concentraciones de DFO por 24 ó 48 horas sobre la proliferación de la línea celular MG-63.

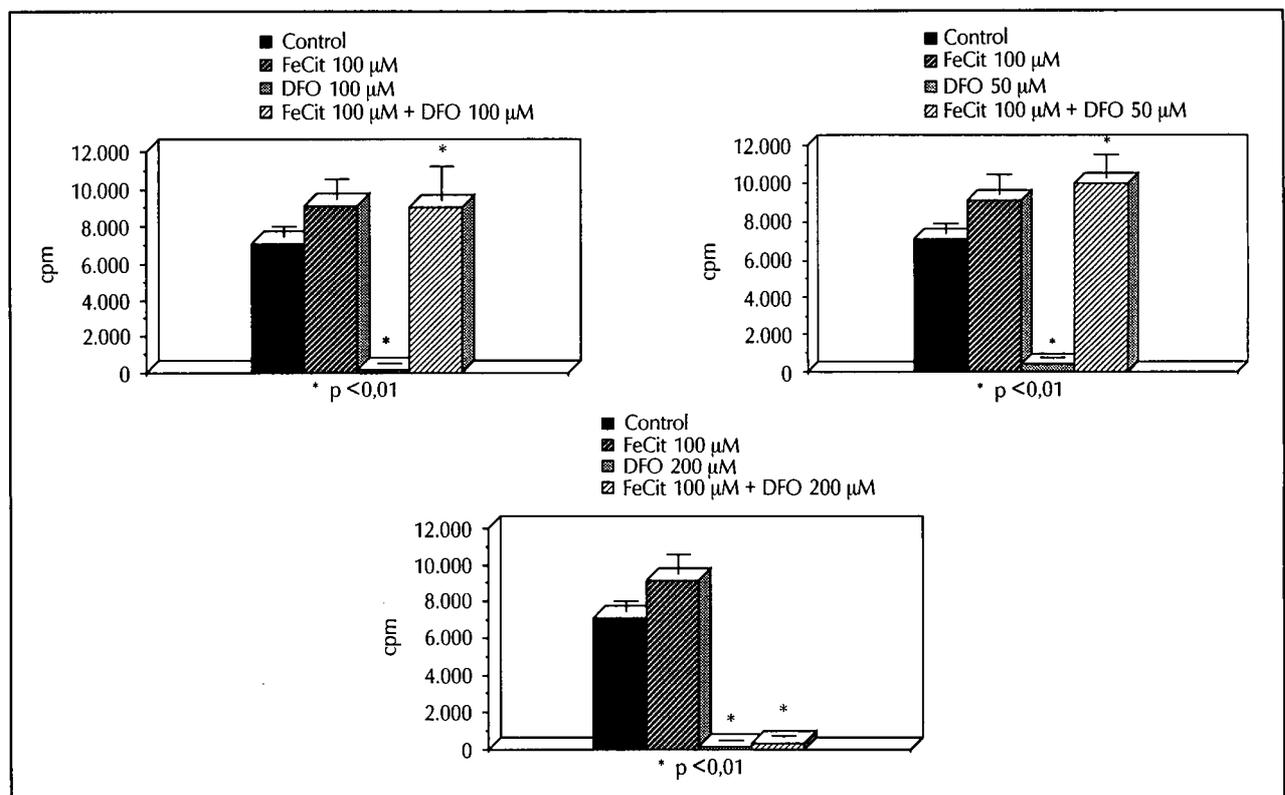


Fig. 2.—Efecto de la adición de citrato de hierro y de la interacción con la desferrioxamina sobre la proliferación de la línea celular MG-63.

## Discusión

La DFO es administrada por la vía parenteral y pocos minutos después de la infusión forma complejos más hidrofílicos con el hierro y con el aluminio, pero una parte de la DFO circulante permanece en la forma libre.

En presencia de función renal normal, la vida media de la DFO es de dos horas; sin embargo, en los pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) en diálisis, ésta puede alcanzar más de 36 horas<sup>6</sup>.

En los últimos años, la indicación más citada de DFO es en el tratamiento de pacientes con IRC intoxicados con aluminio. Estos pacientes tienen alteraciones óseas graves e invalidantes que se atribuyen a la acción del aluminio en el hueso. Con el uso de la DFO en dosis y tiempos de administración variable se ha referido una disminución de los niveles de aluminio en la médula ósea y en el frente de mineralización con mejora del cuadro histológico óseo<sup>7</sup>. Sin embargo, se han descrito efectos tóxicos de la DFO sobre el propio hueso, como la disminución del crecimiento ponderoestatural y alteraciones vertebrales<sup>8</sup> en pacientes talasémicos que han recibido DFO en dosis elevadas por períodos prolongados.

En nuestro estudio se verificó una inhibición de la proliferación de los osteoblastos, cuya intensidad se correlacionó con las concentraciones de DFO en el medio de cultivo. La inhibición más acentuada, de aproximadamente 90 %, se dio frente a la concentración de 100  $\mu$ M, que representa el nivel máximo de DFO encontrado en el suero de pacientes con IRC que reciben 30 mg/kg de DFO<sup>9</sup>.

El escaso efecto inhibitorio de la DFO a bajas concentraciones pudo deberse a la baja dosis del quelante, pero también a la presencia de hierro en el medio de cultivo (1,5  $\mu$ M). Estudios anteriores con otras líneas celulares han demostrado una relación directa entre el efecto antiproliferativo de la DFO y la disminución de la oferta de hierro a la enzima ribonucleótido reductasa responsable de la síntesis proteica celular<sup>10</sup>. Estos datos sugieren que la DFO puede ocasionar depleción celular del metal y consecuentemente afectar al metabolismo celular.

El incremento observado en la proliferación con la adición de citrato de hierro pudo ser debido a la presencia de transferrina saturada al 60 %, proveniente del suero fetal bovino y que suplementó a la célula una cantidad mayor de hierro; pero otra posibilidad es que la propia célula haya sintetizado transferrina, recientemente se ha demostrado que la línea celular U-2 OS, derivada de sarcoma osteogénico humano, tiene expresión genética para sintetizar transferrina<sup>10</sup>. En la última fase del estudio se observó que el efecto de la DFO fue neutralizado por la adición de hierro en condiciones equimolares o en exceso

de hierro, pero esto no se observó si la concentración de DFO superaba a la de hierro en el medio de cultivo. Estudios *in vitro* han demostrado que soluciones de DFO forman complejos catiónicos 1:1 con el hierro; por tanto, se puede suponer que, en nuestro estudio, la presencia en el medio de cultivo celular de un exceso molar de DFO se tradujo en un efecto tóxico celular secundario, debido posiblemente a la depleción de hierro intracelular ocasionado por el quelante.

La DFO es, en el momento actual, la única droga utilizada en el tratamiento de la intoxicación aluminica. Sin embargo, debido a su poder quelante sobre el hierro y, por tanto, a su probable capacidad de inhibir el metabolismo de las células óseas, debe ser administrada a dosis bajas y siempre teniendo en cuenta que esta droga aumentará su toxicidad en estados ferropénicos.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente subvencionado por FICYT 1991-1992 y Universidad de Oviedo.

## Bibliografía

1. Waxman HS, Brown EB: «Clinical usefulness of iron chelating agents». *Progress in Haematology* 6:338-373, 1969.
2. De Sousa M, Brock J: *Iron immunity, cancer and inflammation*. John Wiley & Sons Inc, 605, Third Av, New York, USA, 1989.
3. Ihle BU, Becker GJ, Kincaid-Smith PS: «Clinical and biochemical features of aluminium-related bone disease». *Kidney Int*, 29 (Suppl. 18):S80, 1986.
4. Hunt J, Richards RJ, Harwood R, Jacobs A: «The effect of desferrioxamine on fibroblasts and collagen formation in cell cultures». *Br J of Haematology* 41:69-76, 1979.
5. Hoffbrand AV, Ganeshaguru K, Hooton WL, Tattersall MH: «Effect of iron deficiency and desferrioxamine on DNA synthesis in human cells». *Br J of Haematology* 33:517, 1976.
6. Fosburg M, Hakim RM, Schulman G, Proper R, Lazarus JM, Wolfe L, Gorin R: «Pharmacokinetics (k) of desferrioxamine (D) during treatment of transfusional iron overload (IO) in chronic hemodialysis (HD) patients». *Kidney Int* 25(1):183, 1984.
7. Ott SM, Andress DL, Nebecker HG et al.: «Changes in bone histology after treatment with desferrioxamine». *Kidney Int* 29 (Suppl. 18):S108, 1986.
8. De Virgiliis S, Congia M, Frau F et al.: «Deferoxamine-induced growth retardation in patients with thalassaemia major». *J Pediatr* 113(4):661-9, 1988.
9. D'Haese P: «Aluminium accumulation in patients with chronic renal failure» (thesis). Department of Nephrology/Hypertension. University of Antwerp, 1988.
10. Gwendolyn S, Yang F, Graves D, Buchana JM, Bowman BH: «Expression of transferrin and vitamin D binding protein genes in an osteogenic sarcoma cell line». *Experimental Cell Res* 186:385-389, 1990.