



Universitat Autònoma
de Barcelona

METABOLISMO
FÉRRICO DURANTE
EL TRASPLANTE DE
PROGENITORES
HEMATOPOYÉTICOS

Facultat de Medicina

Tesis
presentada por:
Albert Altés Hernández

Para optar al grado
de Doctor en
Medicina y Cirugía

Director
de la tesis:
Dr. Jordi Sierra Gil

A toda mi familia, genética y política

A mis amigos

Al Dr. Enric Gimferrer

AGRADECIMIENTOS

A todo el equipo médico, de enfermería y administrativo del Servicio de Hematología Clínica, de la Unidad de Hematología Biológica y del Servicio de Genética del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, por su dedicación al trabajo y toda la ayuda que me han prestado.

Mención especial merecen el Dr. Sierra, director de la tesis, y a los doctores/as Brunet, Martino, Sureda, Briones, Baiget, Remacha y Sardá, por su apoyo personal y profesional, así como por su importante participación en la elaboración de los trabajos que configuran esta tesis.

A las becas del Fondo de Investigaciones Sanitarias PI-04/1120, de la Agència d'Avaluació de Tecnologia i Recerca Mèdica 005/29/2004 y de Intensificación en la Investigación del Ministerio Español de Sanidad que han financiado parte de estos trabajos.

A los pacientes, que nos impulsan a mejorar cada día.

INDICE

Glosario de Abreviaturas

1.- MOTIVACIÓN DE LA TESIS

2.- INTRODUCCIÓN

2.1.- Metabolismo del hierro

2.1.1.- Contenido corporal, distribución y funciones del hierro en el organismo

2.1.2.- Absorción intestinal del hierro

2.1.2.1.- Hierro dietético

2.1.2.2.- Entrada de hierro dietético al enterocito

2.1.2.3.- Transferencia del hierro a la circulación sanguínea

2.1.3.- Transporte del hierro

2.1.4.- Captación celular del hierro

2.1.5.- Depósitos de hierro

2.1.5.1.- Ferritina

2.1.5.2.- Hemosiderina

2.1.6.- Excreción del hierro

2.2.- Métodos bioquímicos de evaluación del hierro corporal

2.2.1.- Sideremia o Hierro sérico

2.2.2.- Transferrina sérica y capacidad de fijación del hierro a la transferrina (CFHT)

- 2.2.3.- Saturación de la transferrina (STf)
- 2.2.4.- Ferritina sérica (FS)
- 2.2.5.- Cuantificación bioquímica de hierro en tejido hepático
- 2.3.- Trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH)
 - 2.3.1.- Indicaciones
 - 2.3.2.- Tipos de trasplante
 - 2.3.2.1.- Según la procedencia de los progenitores hematopoyéticos
 - 2.3.2.2.- Según la pareja donante – receptor
 - 2.3.2.3.- Según el tipo de acondicionamiento
 - 2.3.2.4.- Tipos de trasplante aplicados en los pacientes que fueron incluidos en los trabajos relativos a esta tesis.
 - 2.3.3.- Principales complicaciones del trasplante
- 2.4.- Hierro y toxicidad
 - 2.4.1.- El hierro como catalizador de radicales libres
 - 2.4.2.- Acción tóxica del hierro sobre los parénquimas. Hemocromatosis
- 2.5.- Hierro e infección
 - 2.5.1.- Historia del estudio de la relación entre hierro e infección
 - 2.5.2.- La “disponibilidad” del hierro
 - 2.5.3.- Hipoferremia de infección
 - 2.5.4.- Mecanismos microbianos de adquisición de hierro

2.6.- Sobrecarga férrica y TPH

2.6.1.- Sideremia, saturación de transferrina y TPH

2.6.2.- Concentración hepática de hierro en pacientes muertos durante el TPH

2.6.3.- Caracterización de la cinética de la hipersaturación de transferrina y aparición de hierro no unido a transferrina en el TPH

2.6.4.- Primeros estudios clínicos relativos a la sobrecarga férrica durante el TPH

2.6.5.- Sobrecarga férrica, quimioterapia intensiva e infección

2.7.- Hipótesis

2.8.- Objetivos

2.9.- Justificación de la unidad temática de la tesis doctoral

3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.- Resultados

3.1.1.- Iron overload might increase transplant-related mortality in haematopoietic stem cell transplantation.

3.1.2.- Frequent severe liver iron overload after stem cell transplantation and its possible association with invasive aspergillosis

3.1.3.- Early clinical impact of iron overload in stem cell transplantation. A prospective study

3.1.4.- The relationship between transferrin saturation and erythropoiesis during stem cell transplantation

3.2.- Discusión

4.- CONCLUSIONES

5.- BIBLIOGRAFÍA

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- ApoTf: Apotransferrina
- CFHT: Capacidad de fijación del hierro a la transferrina
- Ciclo: Ciclofosfamida
- DMT1: Divalent metal transporter 1 (Transportador de metales divalentes 1)
- EICH: Enfermedad de injerto contra el huésped
- FS: Ferritina sérica
- HCP1: Heme carrier protein 1 (Proteína transportadora del grupo hemo 1)
- ICT: Irradiación corporal total
- IL-1: Interleukina 1
- IL-6: Interleukina 6
- NTBI: Non transferrin bound iron (Hierro no unido a transferrina)
- RTf1: Receptor de transferrina tipo 1
- RTfs: Receptor soluble de la transferrina
- STf: Saturación de la transferrina
- Tf: Transferrina
- TMO: Trasplante de médula ósea
- TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos
- TPHSP: Trasplante de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica
- VIH: Virus de la inmunodeficiencia Humana



Motivación de la tesis

Esta tesis y los artículos que contiene son mi homenaje póstumo al Dr. Enric Gimferrer, hematólogo jefe de Sección del Departamento de Hematología del Hospital de Sant Pau y profesor de Medicina en la Universitat Autònoma de Barcelona.

El Dr. Gimferrer fue un apasionado de su trabajo, un excelente profesor y una buena persona. Colaboró de forma muy activa en la creación del Laboratorio del Departamento de Hematología del Hospital de Sant Pau y posteriormente se especializó en eritropatología. La Dra. Montserrat Baiget, actual directora del Servicio de Genética de Sant Pau y el Dr. Angel Remacha, médico adjunto del Departamento de Hematología fueron sus alumnos aventajados. Ellos firman también parte de los trabajos y me han ayudado muchísimo en la elaboración de este proyecto.

En los últimos años de su carrera, y desgraciadamente también de su vida, el Dr. Gimferrer se superespecializó en el estudio del metabolismo del hierro. Fue un hombre de laboratorio, y se le escapaba la posibilidad de estudiar a los pacientes que se trataban en hematología clínica. Sin embargo, él conocía

bien el papel central que el hierro juega en biología, y observaba con desesperación que muchos pacientes en proceso de trasplante presentaban parámetros férricos tremendamente anormales. El Dr. Gimferrer siempre quiso investigar qué repercusión clínica podían tener las alteraciones del metabolismo del hierro en estos pacientes, pero nunca pudo realizar sus deseos.

Pero, casi sin quererlo, el Dr. Gimferrer contagiaba a los que le conocían con su entusiasmo. Y también me contagió a mí. Terminado mi periodo de residencia me convertí en adjunto del Servicio de Hematología Clínica del Hospital de Sant Pau, y alterné mi trabajo cotidiano con los pacientes con la realización de trabajos de investigación en otras áreas; pero intenté siempre reservar tiempo para desarrollar aquellos trabajos clínicos que le hubieran interesado al Dr. Gimferrer.

Esos trabajos son los que hoy recoge esta tesis doctoral. Me enorgullece decir que estos trabajos han sido pioneros de una nueva rama de estudio en el trasplante hematopoyético, como demuestra el hecho de que nuevos trabajos internacionales, más amplios y mejo-

res, han citado nuestros resultados y los han corroborado. Pero honestamente, debo admitir que ese mérito no es mío. Ese mérito es del Dr. Gimferrer que siempre creyó en la importancia del hierro y en el poder de la Ciencia para desentrañar sus misterios. Y yo siento muchísimo que él ya no pueda verlo.



Dr. Enric Gimferrer



2 Introducción

El hierro es un elemento químico imprescindible para la vida. A nivel de la biosfera, la concentración de hierro en las aguas oceánicas supone el factor limitante para el crecimiento del fitoplancton marino, que a su vez es el primer consumidor de CO_2 y la principal fuente de oxígeno atmosférico (www.palomar.edu). A nivel celular, el hierro forma parte del grupo prostético de la ribonucleótido reductasa. Esta enzima tiene por función la producción de desoxiribonucleótidos a partir de ribonucleótidos, para poder así asegurar la biosíntesis del A.D.N. (Figura 1). Por último, el hierro forma parte fundamental de las proteínas transportadoras del oxígeno (hemoglobina, mioglobina) y de los enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial. El hierro es fundamental tanto para nuestra especie como para cualquier tipo de bacteria u hongo patógeno.

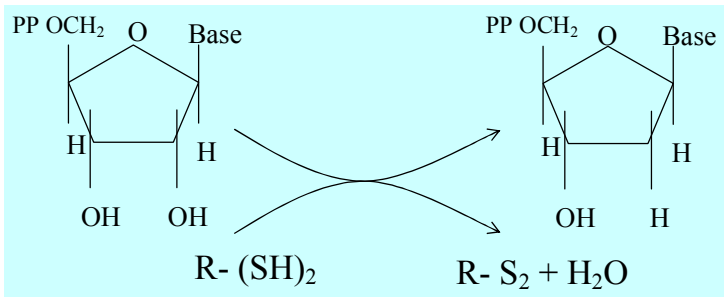


Figura 1: Formación de difosfatos desoxi-ribonucleósido a partir de ribonucleótidos catalizada por la ribonucleótido reductasa.

Dada la importancia biológica del hierro, es lógico que se establezca un conflicto entre los microorganismos patógenos y sus huéspedes por el control del mismo. En situación de sobrecarga férrica perdemos una parte importante de ese control y ello conlleva dos consecuencias, se incrementa el daño tóxico generado por hierro y se establece una ventaja de los microorganismos para utilizar nuestras propias reservas de hierro a su favor.

Desde hace algunos años disponemos de elementos teóricos para sospechar que la sobrecarga de hierro puede influir en la aparición de complicaciones tóxico-infecciosas relacionadas con el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). En esta introducción, a la vez que se repasará el relevante papel que tiene el hierro en nuestro metabolismo, también se detallarán los efectos tóxicos que éste elemento puede generar. Asimismo, se demostrará que el exceso de hierro puede conllevar un incremento en la aparición de episodios infecciosos, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos. Posteriormente, se introducirán conceptos relativos al trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) necesarios para com-

prender los apartados siguientes para, finalmente, exponer las pocas evidencias existentes al inicio de esta tesis doctoral que relacionaban la sobrecarga férrica con la aparición de eventos tóxicos e infecciosos en el curso del TPH.

2.1. **M**ETABOLISMO DEL HIERRO

2.1.1. **C**ONTENIDO CORPORAL, DISTRIBUCIÓN Y FUNCIONES DEL HIERRO EN EL ORGANISMO

El cuerpo humano contiene aproximadamente de 3,5 a 4 g de hierro en la mujer y de 4 a 5 g en el hombre (Papanikolaou y Pantopoulos, 2005). El hierro se distribuye en el organismo en tres compartimentos: el funcional, el de transporte y el de reserva.

El compartimiento funcional está formado principalmente por proteínas con estructura porfirínica, tales como la hemoglobina y la mioglobina. Además forma parte fundamental de otras enzimas que realizan importantes funciones metabólicas que requieren hierro como cofactor o como grupo prostético. Aproximadamente el 65% del hierro del organismo se

encuentra formando parte de la hemoglobina y el 15% está contenido en otras proteínas del compartimiento funcional (mioglobina en las fibras musculares, citocromos, catalasas y peroxidases) (Andrews, 1999).

El compartimiento de transporte está constituido por la transferrina (Tf) que es una glicoproteína que transporta el hierro por la sangre desde el intestino (absorción) y el sistema reticuloendotelial (reciclado) hasta los tejidos que lo precisan, muy en especial hacia la médula ósea para la síntesis de hemoglobina y hacia el hígado para su almacenamiento. El hierro unido a transferrina representa una parte muy pequeña del hierro corporal, entre el 0,1 – 0,2% del total.

El tercer compartimiento, el de reserva, está constituido por compuestos proteicos (ferritina y hemosiderina) que constituyen las reservas corporales de este metal. La ferritina se encuentra en muchos tejidos, y en la mucosa intestinal cumple una función de regulación de la absorción al impedir que el hierro se absorba hacia el plasma cuando los depósitos del organismo son abundantes. Esta función es muy importante ya que una vez absorbido

se elimina muy poco hierro y su exceso puede ser perjudicial. En este compartimento se encuentra aproximadamente el 20 – 30% del hierro del organismo (equivale aproximadamente a 1 gramo en el varón adulto y algo menos en la mujer).

Las relaciones existentes entre los tres compartimentos se muestran en la figura 2.

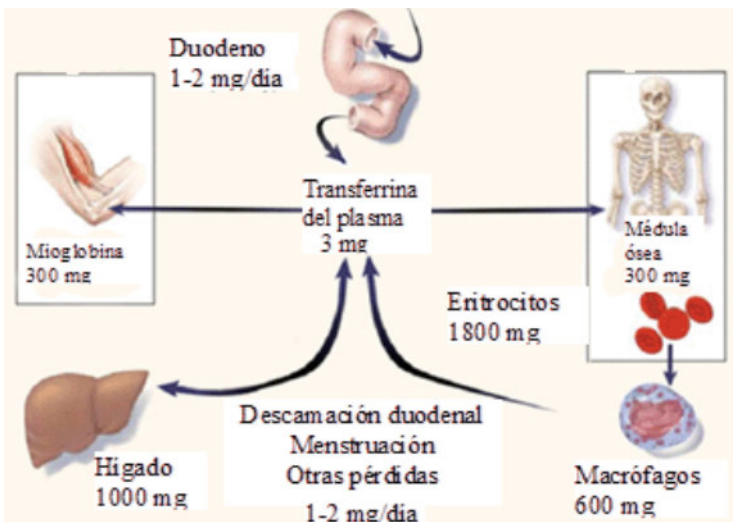


Figura 2: Ciclo del hierro. Cada día se absorben a nivel duodenal 1-2 mg de hierro, que serán los que aproximadamente se perderán diariamente. El hierro corporal se halla en compartimentos funcionales (hemoglobina, mioglobina, médula ósea), formando parte de enzimas, en proceso de reciclaje en macrófagos o en depósito fundamentalmente hepático. Adaptado de la Biblioteca John Hopkins, E.E.U.U.

Un adulto sano absorbe diariamente entre 1–2 mg de hierro de la dieta, que compensa con las pérdidas no específicas por la descama-

ción de las células de la piel y del intestino (mediante orina, sudor, bilis y heces). Además de estas pérdidas basales (0,8–1 mg/día) existen otras pérdidas de hierro añadidas que pueden corresponder a situaciones fisiológicas como la menstruación y el embarazo, o situaciones patológicas acompañadas de pérdida de sangre. En total, las pérdidas diarias corresponden entre 1–2 mg de hierro al día.

La eritropoyesis requiere aproximadamente unos 30 mg de hierro al día. Esta importante cantidad de hierro proviene principalmente del hierro reciclado en los macrófagos del sistema retículo endotelial. Éstos eliminan los eritrocitos senescentes y ceden el hierro obtenido de dicha fagocitosis a la transferrina plasmática, que lo conducirá hasta la médula ósea para posibilitar la hemoglobinización de los hematíes.

2.1.2. **A**BSORCIÓN INTESTINAL DEL HIERRO

Las necesidades diarias de hierro son muy bajas en comparación con el hierro circulante, por lo que sólo se absorbe una pequeña proporción del hierro total ingerido. La cantidad

absorbida varía de acuerdo con la cantidad y el tipo de hierro presente en los alimentos, del estado de los depósitos corporales del mismo, de la actividad eritropoyética y de una serie de factores lumbinales e intralumbinales que Interfieren o facilitan la absorción. El balance de hierro del organismo se mantiene en unos márgenes estrechos, regulado a través de la absorción intestinal (Andrews, 1999).

El proceso de absorción de hierro puede dividirse secuencialmente en dos etapas: 1) la entrada del hierro dietético en el enterocito, 2) el paso del hierro del enterocito a la circulación.

2.1.2.1. **H**IERRO DIETÉTICO

Diferenciamos dos tipos de hierro en los alimentos. El denominado hierro hemo forma parte de porfirinas y se encuentra formando parte de la hemoglobina y mioglobina que se hallan en la sangre, vísceras y tejido muscular. Este tipo de hierro se absorbe muy bien, pero sólo representa una pequeña fracción del total de la dieta. El otro hierro presente en los alimentos es el hierro no hemo (o hierro inorgá-

nico). Lo encontramos como hidróxido de hierro, sales de hierro o proteínas férricas. El hierro no hemo se encuentra de forma abundante en los alimentos, pero su absorción es mucho menor que la del hierro hemo y depende de factores dietéticos y fisiológicos (Arija y Viteri, 2006).

2.1.2.2. ENTRADA DEL HIERRO DIETÉTICO AL ENTEROCITO

El hierro se absorbe de forma activa en las células epiteliales del duodeno y primera porción del yeyuno, decreciendo su absorción hasta la zona distal del intestino delgado. El enterocito maduro presenta dos superficies. La apical, es la que se encuentra en contacto con la luz intestinal y contiene microvellosidades que constituyen el llamado borde en cepillo. En esta membrana es donde se producirá la absorción del hierro de la dieta. La superficie basolateral es la que está en contacto con los vasos sanguíneos y es por donde el hierro abandonará el enterocito para incorporarse a la circulación sanguínea.

El hierro no hemo de la dieta se encuentra principalmente oxidado (Fe^{3+}) y es insoluble a

pH superior a 3. Sin embargo, en el estómago el pH es inferior a este dintel, por lo que allí se forman complejos solubles del metal y se aumenta su biodisponibilidad para poder ser absorbido en el duodeno. La presencia de agentes reductores en el duodeno procedentes de la dieta y de la enzima ferrireductasa (Duotonal cytochrome B) (McKie y cols, 2000) reducen gran parte del Fe^{3+} en Fe^{2+} . Este último puede ser transportado a través de la membrana apical del enterocito al interior de la célula intestinal mediante una proteína transportadora de cationes divalentes denominada DMT1 (Divalent metal transporter 1). Los iones Fe^{3+} también pueden ser transportados aunque con mayor dificultad y mediante un mecanismo más complejo, que incluye el uso de proteínas de la familia de las integrinas. El hierro hemo atraviesa la membrana celular como una metaloporfirina intacta gracias a la proteína transportadora HCP1 (Heme carrier protein 1) (Shayeghi y cols, 2005).

2.1.2.3. TRANSFERENCIA DEL HIERRO A LA CIRCULACIÓN SANGUÍNEA

Una vez el Fe^{2+} se encuentra en el interior del enterocito, puede ser almacenado en forma de ferritina y excretado en las heces cuando se produce la descamación de los enterocitos senescentes o bien es transportado a través de la membrana basolateral hacia el plasma, a través de una proteína transportadora de membrana llamada Ferroportina (Figura 3). (Donovan y cols., 2000). La proteína de membrana Hefaestina o bien la proteína plasmática Ceruloplasmina promueven la oxidación del hierro gracias a su actividad ferroxidasa, facilitando de esta manera su incorporación a la transferrina circulante (Vulpe y cols., 1999).

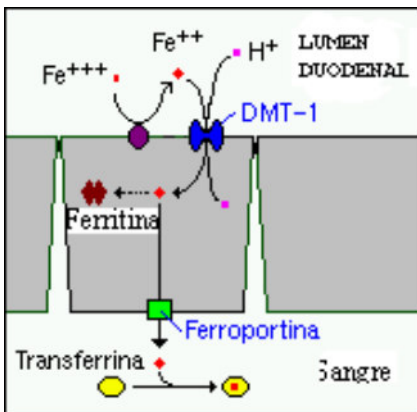


Figura 3: Una vez reducido, el Fe^{2+} es cotransportado con un protón por la proteína DMT-1 a nivel de la membrana apical. En el enterocito, el hierro puede ser utilizado, almacenado en forma de ferritina o transportado a la sangre mediante la proteína de transporte ferroportina. Finalmente, el hierro se unirá a la transferrina para su transporte por el torrente circulatorio.

Adaptado de
www.vivo.colostate.edu

2.1.9. TRANSPORTE DE HIERRO

El hierro en plasma es transportado fundamentalmente por la Transferrina (Tf), que es una glicoproteína plasmática de aproximadamente 80 kDa de peso molecular (Huebers y Finch, 1987). La Tf está constituida por una única cadena polipeptídica a la que se unen hidratos de carbono formando dos ramas idénticas y casi simétricas (Figura 4). Se sintetiza en el hígado y posee 2 dominios homólogos de unión para el hierro férrico (Fe^{3+}). La Tf capta el hierro liberado por los macrófagos (producto de la destrucción de los hematíes) o el dietético procedente de la absorción intestinal, y lo transporta para hacerlo disponible a todos los tejidos que lo requieren (Wick y cols., 1996). Por cada ión férrico que se incorpora, se liga concomitantemente un anión carbonato o bicarbonato y se liberan, aproximadamente, tres protones. Se denomina apotransferrina (apoTf) a la Tf que no contiene hierro, transferrina monoférrica cuando contiene un átomo de hierro y diférrica cuando contiene dos.

Cuando todos los sitios de transporte están ocupados consideramos que la transferrina se

halla saturada. Normalmente, sólo el 30% de la Tf plasmática está saturada y, por tanto, la reserva total de esta proteína actúa como amortiguador frente a grandes cantidades de hierro absorbido o liberado, hierro que de otra manera, resultaría tóxico. En situaciones de saturación de la capacidad de transporte de la Tf, el hierro puede unirse a otros ligandos, como el citrato, constituyendo el llamado pool de hierro no unido a Tf (NTBI, non transferrin bound iron) (Pérez y cols., 2005).

Del total de hierro transportado por la Tf, entre el 70 y el 90% es captado por las células eritropoyéticas (Finch y cols., 1982) y el resto es captado por los tejidos para la síntesis de citocromos, mioglobina, peroxidasas y otras enzimas y proteínas que lo requieren como cofactor.

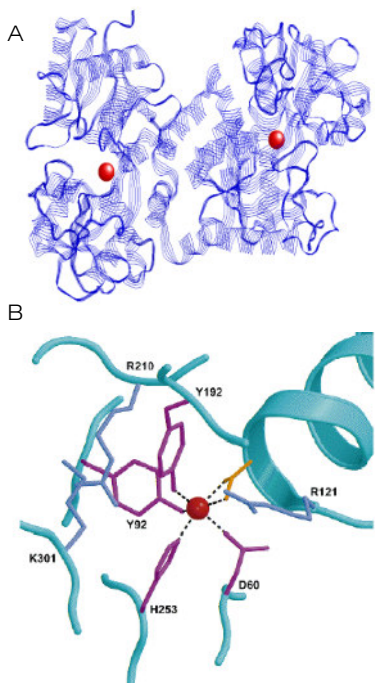


Figura 4. Estructura y sitios de unión de la transferrina.

A: Estructura terciaria y cuaternaria de la transferrina, con representación de los dos sitios de unión al hierro (rojo).

B: Representación del lugar de unión hierro-Transferrina.

Adaptado de www.stanford.edu

2.1.4.

CAPTACIÓN CELULAR DEL HIERRO

Todos los tejidos y células de los mamíferos poseen un receptor específico para la transferrina (RTf1) (Figura 5), a través de cuya expresión en la superficie celular, regulan la captación del hierro de acuerdo con sus necesidades (Figura 6). Estos RTf1 se expresan en mayor número en las células hepáticas, de placenta y sobre todo en los progenitores eritroides (eritroblastos). En los eritroblastos se encuentra el 80% del total de los RTf1 del organismo. Allí, el hierro es captado por las mitocondrias para ser incluido en las moléculas de protoporfirina durante la síntesis del grupo hemo (Gimferrer y cols., 1996).

El número de receptores es aproximadamente constante en las células en reposo, pero aumenta marcadamente durante la proliferación celular. Una vez en el citoplasma, el ión ferroso incorporado puede seguir tres destinos:

- El pool de utilización, es decir, las proteínas celulares que requieren hierro
- El pool de almacenamiento, constituido principalmente por ferritina y hemosiderina

- El pool regulador, el cual incluye a las proteínas encargadas de detectar variaciones en los niveles intracelulares del metal

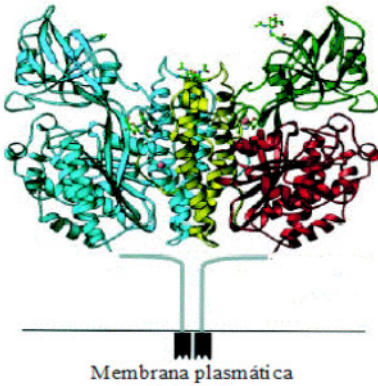


Figura 5: Estructura terciaria y cuaternaria del receptor celular de la transferrina.

Adaptado de www.stanford.edu

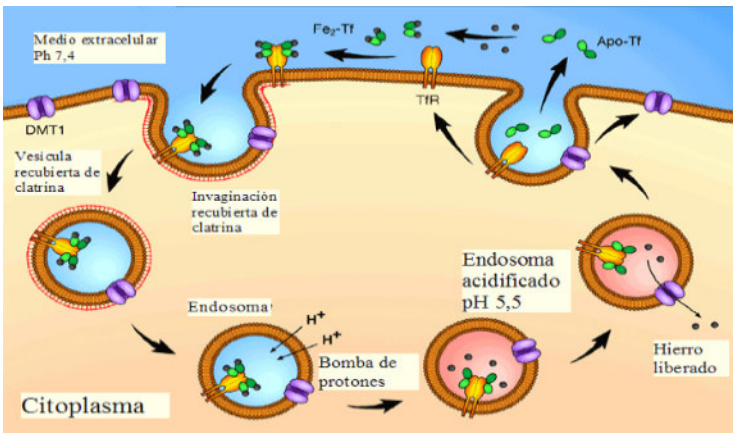


Figura 6: Incorporación del hierro a las células. La transferrina unida a hierro se une al receptor de transferrina que se halla en la membrana citoplasmática de la célula. Por acción de una proteína de membrana llamada clatrina, los receptores de transferrina unidos a Tf-hierro se agrupan en zonas de la membrana que se invaginan, formando endosomas. Estos endosomas acidifican su medio interno gracias a la acción de bombas de protones. En el medio acidificado, el hierro se separa de la transferrina y es transportado al citoplasma por la proteína de membrana DMT-1. Finalmente, la vesícula endosómica se une a la membrana citoplasmática y los receptores de transferrina liberan de nuevo a la transferrina en la membrana citoplasmática. Todas las proteínas se reutilizan para posibilitar nuevos ciclos de transporte. Adaptado de www.walz.med.harvard.edu

En situaciones de gran sobrecarga férrica, cuando la disponibilidad de la apoTf es insuficiente para cumplir con la distribución de hierro a las células y, por ello, el metal circula en plasma en forma de complejos de bajo peso molecular, éste puede ser removido de la circulación y entrar en las células mediante un sistema de transporte independiente de la Tf y los RTf1 (Sturrock y cols., 1990). Han sido aisladas e identificadas dos proteínas (una de membrana y otra citosólica) involucradas en la captación de iones férricos por la vía independiente de Tf-RTf1. Éstas poseen tamaño molecular y características inmunológicas similares a las proteínas β 3-integrina y mobilferrina, caracterizadas como mediadoras de la captación de hierro en las células de la mucosa intestinal, las cuales carecen de RTf1 en su superficie absortiva (Conrad y cols., 1994). Este sistema transportaría hierro férrico. Por otra parte, se ha descrito un mecanismo para la incorporación de iones ferrosos, el cual también podría traslocar el hierro presente en estado férrico, dependiendo de un paso previo de reducción. En este caso, la proteína transportadora transmembrana ha sido identificada en

células eritroides de ratones normales y anémicos como la DMT1, proteína ya citada anteriormente como mediadora de la absorción de iones ferrosos por parte de los enterocitos.

2.1.5. DEPÓSITOS DE HIERRO

El compartimiento de hierro en depósito almacena entre 500 y 1500 mg de hierro en el hombre, y entre 300 y 1000 mg en la mujer. El exceso de hierro se deposita intracelularmente asociado a ferritina y hemosiderina, fundamentalmente en el sistema monocito-macrófago del bazo, del hígado y de la médula ósea (Andrews, 1999).

2.1.5.1. FERRITINA

La mayoría de las células del organismo contienen ferritina, pero su concentración es mayor en el parénquima hepático y en el Sistema Reticulo Endotelial (SER) del hígado, bazo y médula ósea.

La ferritina es una proteína de depósito tisular de hierro que posee una forma esférica, de unos 12 nm de diámetro y con un peso

molecular superior a 440.000 dalton (Figura 7). Se compone de dos capas. La más exterior es proteica (apoferritina) y está constituida por un heteropolímero de 24 subunidades de 2 tipos diferentes con un peso molecular de 20 kDa cada una, formadas por 4 cadenas helicoidales. La capa interna es una cavidad hueca (núcleo férrico) de 7,5 nm que rodea a los cristales de hierro y es una mezcla de las dos subunidades de ferritina, la H (Heavy) o forma pesada con actividad ferroxidasa y la L (Light) o ligera cuya función es nucleadora del hierro y es realmente la molécula de depósito (Jacobs, 1985). En el núcleo férrico hay aproximadamente 2.500 a 4.500 iones de hierro almacenados como cristales de hidróxido fosfato férrico. La ferritina H es absolutamente necesaria y su ausencia es incompatible con la vida. Su función ferroxidasa hace que el Fe^{2+} intracelular pase a Fe^{3+} y sea incorporado a los cristales de hidróxido fosfato férrico. Las variaciones en el contenido de las subunidades que componen la molécula de apoferritina determinan la existencia de diferentes isoformas. Para que el hierro almacenado pueda ser liberado del macrófago

debe ser antes reducido a la forma ferrosa, y una vez en el plasma deberá sufrir el proceso inverso (oxidación) para poder ser incorporado a la transferrina que lo transporta y distribuye al resto del organismo.

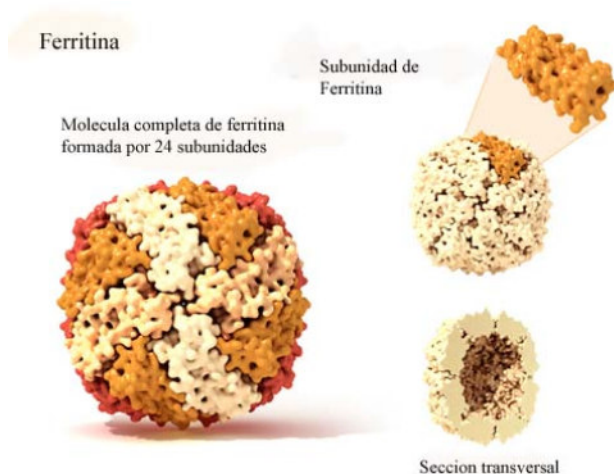


Figura 7. Esquema de la estructura de la molécula de ferritina. La ferritina está constituida por 24 subunidades idénticas ensambladas de tal modo que dejan espacio a una cavidad central capaz de albergar hasta 4.500 átomos de hierro.
Fuente: U.S. Nacional Library of Medicine.

La ferritina no se encuentra solamente en el interior de la célula, sino también circulando en el plasma (es la que podemos medir). La ferritina sérica se encuentra en equilibrio con el hierro de depósito del organismo y por lo tanto indica la magnitud de dicho depósito

(Finch y cols., 1986). Niveles de ferritina sérica > 300 µg/l en los hombres y > 200 µg/l en las mujeres son indicativos de sobrecarga férrica. Sin embargo, las concentraciones séricas pueden estar elevadas independientemente de los depósitos del metal en presencia de ciertos síndromes clínicos, entre los que se incluyen la enfermedad renal, la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la infección o inflamación sistémica no asociada a VIH y los procesos neoplásicos (Hernández y cols., 2000).

2.1.5.2. Hemosiderina

La ferritina celular se encuentra en el citoplasma, pero puede pasar a los lisosomas que al digerirla forman a partir de ella estructuras paracristalinas peor definidas, constituidas en un 50% por agregados insolubles de hierro no movilizable y restos orgánicos de lípidos, fosfatos y péptidos. Estas estructuras constituyen la hemosiderina (Finch y cols 1984). A diferencia de la ferritina, la hemosiderina es insoluble en agua. Aunque ambas proteínas son inmunológicamente idénticas, la hemosiderina

contiene un porcentaje mayor de hierro (30%) y al microscopio se observa en forma de agregados de moléculas de ferritina con conformación diferente de los cristales de hierro. La hemosiderina parece preservar a la célula de los efectos nocivos del hierro libre en situaciones de sobrecarga, pero a diferencia de la ferritina, el hierro que contiene es casi inmobilizable.

2.1.6. Excreción del hierro

La capacidad de excreción del hierro del organismo humano es muy limitada. Por ello, el equilibrio en la concentración corporal de hierro necesariamente se basa en el control de la absorción.

Diariamente se eliminan 1 a 2 mg de hierro. En el adulto, las pérdidas obligadas de hierro son entre 0,2-0,5 mg por descamación de la piel, entre 0,1-0,3 por orina y entre 0,6-0,7 por heces. El hierro eliminado por las heces procede fundamentalmente del hierro de la dieta no absorbido y del contenido en las células descamadas del tracto intestinal. (Petersen y cols., 1996). En las personas sanas, la elimi-

nación de hierro en la orina es insignificante, debido a que circula unido a proteínas que no se filtran por los glomérulos renales.

En la mujer, de la pubertad a la menopausia, hay que añadir las pérdidas relacionadas con las hemorragias menstruales (0,4–0,5 mg/día). Además de las pérdidas fisiológicas, se pueden producir en ocasiones pequeñas pérdidas patológicas por micro-hemorragias, como en las neoplasias digestivas, hemorroides, úlceras, toma regular de algunos medicamentos (aspirina, anticoagulantes) y algunas parasitosis digestivas.

2.2.

MÉTODOS BIOQUÍMICOS DE EVALUACIÓN DEL HIERRO CORPORAL

El contenido en hierro del organismo se deduce a partir de algunos índices bioquímicos. También puede obtenerse una medida directa mediante la cuantificación bioquímica de hierro en tejido hepático.

2.2.1. **S**IDEREMIA O HIERRO SÉRICO

La medida de la sideremia da una idea de la cantidad de hierro de transporte. El hierro del compartimento de transporte representa menos del 1% del hierro corporal. La interpretación de los niveles de hierro puede llevar a error ya que la sideremia experimenta grandes fluctuaciones dado que fisiológicamente depende de un ritmo circadiano (durante la noche disminuye de un 20 a un 30%) y además, con la ingesta de alimentos hay un incremento de hierro en la etapa postprandial. Existen otras situaciones que interfieren en los niveles de hierro, por ejemplo, disminuye en la segunda mitad del embarazo, menstruación, lactancia o adolescencia, en procesos inflamatorios, en el déficit de hierro o la anemia de los procesos crónicos (asociada al bloqueo de hierro en el sistema reticuloendotelial) y aumenta en el caso de transfusiones, intoxicación férrica, hemocromatosis primaria o secundaria y histolisis.

En éste trabajo, el hierro sérico se ha medido mediante el sistema Roche/Hitachi 911 y el método comercial COBAS. En este método, la muestra se mezcla con un detergente/tampón

para acidificar la muestra a un pH inferior a 2. De ese modo el pH ácido libera el hierro de la transferrina y el hierro se reduce a Fe^{2+} mediante el uso de ascorbato. El Fe^{2+} reacciona con el compuesto FerroZine formando un complejo coloreado. La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de hierro y puede medirse fotométricamente.



Sistema Roche/Hitachi 911

2.2.2.

Transferrina sérica y capacidad de fijación del hierro a la transferrina (CFHT)

El nivel de transferrina sérica y la capacidad de fijación del hierro a la transferrina, junto con la saturación de la transferrina, son parámetros que se relacionan con el intercambio de hierro entre el sistema reticuloendotelial y la médula ósea. La transferrina es la proteína

que transporta el hierro en la circulación y casi todo el hierro plasmático se encuentra unido a ella. Como consecuencia de ello, el contenido de hierro en el suero en situación de saturación refleja el número de átomos de hierro unidos a la transferrina. Cada molécula de transferrina puede unir hasta dos átomos de hierro, razón por la cual la CFHT está relacionada con la fracción de sitios libres que posee la transferrina para el transporte de hierro, por lo que la CFHT es realmente una medida de nivel de transferrina sérica, ya que mide la cantidad de proteínas que fijan el hierro.

En este estudio se ha medido directamente la CFHT en el sistema Roche/Hitachi 911 mediante el test comercial UIBC de Roche. En este test, el suero del paciente se mezcla con un reactivo tampón con una concentración conocida de hierro que saturará todos los lugares de unión de la transferrina. Se usa FerroZime como cromógeno que reaccionará con el Fe^{2+} libre previa reducción del Fe^{3+} con un agente reductante (ver determinación de sideremia). La diferencia entre la concentración de hierro del reactivo y la final

en la muestra constituirá la capacidad de unión de hierro no saturada. Si a este parámetro se le suma la sideremia del paciente, el resultado es la CFHT (una medida indirecta de la concentración de transferrina). Los niveles de transferrina y CFTH aumentan en el déficit de hierro y disminuyen en la sobrecarga de hierro y en la anemia de los trastornos crónicos.

2.2.3. **Saturación de la transferrina (STf)**

La STf nos indica el porcentaje de sitios de unión de la transferrina ocupados por el hierro. Se calcula como la relación entre la sideremia y la CFHT multiplicada por 100 . La STf está directamente relacionada con los depósitos de hierro en los individuos sanos y junto con el hierro sérico y la CFHT son particularmente útiles para diferenciar los estados deficitarios de hierro de causas nutricionales con respecto de aquellos que son consecuencia de diferentes patologías (asociadas a procesos de infección e inflamación crónicos). Cuando la STf es elevada puede existir sobrecarga de hierro. Cuando la STf supera el 80% aparece

hierro libre no unido a transferrina que parece ser el evento primordial mediador de la toxicidad tisular del hierro.

2.2.4. Ferritina sérica (FS)

La FS tiene una estructura similar a la ferritina intracelular, pero está glicosilada. Probablemente se trata de una proteína de excreción aunque su función es desconocida. La FS se encuentra en equilibrio con su forma intracelular y es proporcional al contenido de hierro de los depósitos por lo que en los casos de sobrecarga de hierro, la FS se encuentra elevada. Sin embargo, la FS es un reactante de fase aguda y por ello existen diferentes factores como la infección aguda o crónica, deficiencia de vitamina B12 y ácido fólico, consumo excesivo de alcohol, leucemia o enfermedades hepáticas que producen un aumento significativo de FS. Por ello, una concentración alta de FS no confirma la sobrecarga de hierro, pero unos niveles normales sí permiten descartarla. La concentración de FS suele aumentar con la edad, y es mayor en hombres que mujeres. También el

sobrepeso y obesidad pueden aumentar la FS (síndrome metabólico).



Sistema Roche Elecsys 2010

La FS se ha medido mediante el sistema Roche Elecsys 2010 y el reactivo comercial COVAS. Este método se basa en un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia. Se incubaba la muestra de suero con un anticuerpo monoclonal biotinilado específico anti-ferritina y un anticuerpo monoclonal anti-ferritina marcado con quelato de rutenio, los cuales forman un complejo "sandwich". A continuación se añaden micropartículas recubiertas de estreptavidina y el complejo formado se fija a la fase sólida por interacción

entre la biotina y la estreptavidina. La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados son eliminados. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador. Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración.

2.2.5. **C**uantificación bioquímica de hierro en tejido hepático

El método de referencia para la estimación de la cantidad corporal de hierro es la cuantificación bioquímica del hierro en tejido hepático. En esta tesis se ha empleado un método que no utiliza espectrometría de masas (el método más empleado), sino métodos más cercanos al hematólogo. El método utilizado consiste en la desecación de la pieza de biopsia y pesado con balanza de precisión. Posteriormente se disuelve la pieza en medio líquido y libera el hierro presente

que se mide en solución mediante el método de la sideremia.

2.3. TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS (TPH)

En 1990, el Dr. E. Donnall Thomas del centro médico Fred Hutchinson en Seattle, recibió el premio Nobel de Medicina y Fisiología por sus relevantes contribuciones al trasplante de médula ósea (TMO). A principios de los años 90, el Dr. Thomas visitó el Hospital de Sant Pau, por lo que tuve oportunidad de conocerle a la vez que mis colegas (Figura 8).



Figura 8: Visita del Prof. Donald Thomas al Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. El Prof. Thomas se halla con su esposa en el centro rodeado de parte del personal facultativo del Servicio de Hematología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Cuando el Dr. Thomas inició sus estudios en trasplante hematopoyético, la lógica en la que se asentaba el procedimiento era sencilla; eliminar por completo la médula ósea enferma de un paciente con leucemia para sustituirla por médula ósea de un donante sano. Los riesgos tóxicos (secundarios al tratamiento erradicador aplicado) e infecciosos (debidos al largo periodo de neutropenia previo a la recuperación de la función hemopoyética) eran patentes desde un principio. A ellos se añadió la temible “enfermedad secundaria” que ahora conocemos como enfermedad de injerto contra huésped (EICH). Esta complicación, debida a la incompatibilidad entre los sistemas mayores de histocompatibilidad de donante y receptor, no era conocida en los tiempos en que el Dr. Thomas iniciaba sus investigaciones. El TMO entre individuos genéticamente distintos no progresó hasta la aparición de nuevas drogas inmunosupresoras como la ciclosporina, aunque con una alta morbi-mortalidad de carácter infeccioso.

Con el paso de los años, el TMO se ha diversificado. Sus indicaciones se han ampliado, se utilizan otras fuentes de progenitores hemato-

poyéticos además de la médula ósea, los trasplantes no sólo se hacen entre individuos genéticamente emparentados, y han aparecido modalidades de trasplante con acondicionamientos muy inmunosupresores pero de toxicidad reducida. A continuación se repasará sucintamente los diversos tipos de trasplante y al final se citarán los tipos de trasplante utilizados en los pacientes que formaron parte de los estudios constitutivos de esta tesis doctoral.

2.3.1. Indicaciones

La indicación inicial del TPH fue el tratamiento de la leucemia aguda, con la intención de sustituir una médula ósea enferma (que se erradica con el llamado tratamiento de acondicionamiento) por una sana procedente de un donante. Las indicaciones del TPH se han ampliado enormemente y se siguen ampliando (Goldman J y col, 1998). Se han realizado trasplantes en pacientes con todo tipo de neoplasias hematológicas, en pacientes con tumores sólidos y con aplasia medular. También se han practicado trasplan-

tes en pacientes con enfermedades genéticas que afectan la médula ósea o que causan inmunodeficiencia congénita. Incluso se han realizado trasplantes en pacientes afectados de enfermedades autoinmunes. Esta diversificación de indicaciones ha sido posible porque también se han diversificado los objetivos del propio TPH. En algunos casos, el objetivo puede ser únicamente inmunodeprimir al paciente y conseguir una reconstitución inmune más favorable (TPH en enfermedades autoinmunes). En otros, el objetivo es sustituir la hemopoyesis enferma pero no neoplásica por otra sana, aunque sin intención de erradicar completamente a la primera (TPH en enfermedades genéticas). En otros casos el objetivo no es el trasplante en sí, sino simplemente la posibilidad de administrar dosis de radio-quimioterapia que superen la barrera hematológica de toxicidad (TPH autólogo).

2.3.2. Tipos de trasplante

2.3.2.1. Según la procedencia de los progenitores hematopoyéticos

Inicialmente, la fuente de progenitores hematopoyéticos fue la médula ósea (TMO). Para extraer los progenitores era imprescindible someter al donante, anestesiado y en quirófano, a múltiples punciones medulares con el objeto de extraer con cada una de ellas una pequeña cantidad de sangre medular rica en progenitores. Posteriormente se descubrió que es posible aislar progenitores hematopoyéticos directamente de la sangre periférica, sobre todo si antes se incrementa su número causando “estrés medular”, ya sea provocando una aplasia de corta duración mediante quimioterapia o bien administrando factores de crecimiento hematopoyético, o ambas cosas (Urbano-Ispizua A, 2000). La puesta a punto de sistemas automáticos de aféresis con capacidad de separar la fracción sanguínea rica en progenitores (figura 9) ha posibilitado en los últimos años que la donación de progenitores devenga más sencilla.



Figura 9: Sistema de aféresis Cobe – Spectra. Se trata del sistema de aféresis utilizado para la recolección de progenitores de sangre periférica de la mayor parte de donantes en los trabajos que constituyen esta tesis.

Con esta nueva tecnología sólo es necesario administrar factor de crecimiento de granulocitos y posteriormente recoger los progenitores mediante algunas sesiones de aféresis. Esta nueva tecnología permitió realizar los trasplantes de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica (TPHSP) que, además de incrementar la comodidad de la donación, producen unos menores tiempos de aplasia. Por último, en años recientes, el trasplante de sangre de cordón umbilical se ha convertido en una técnica común, en la que los progenitores proceden de la sangre de un cordón umbilical previamente criopreservada.

2.3.2.2. Según la pareja donante-receptor

Según este criterio de clasificación, los TPH pueden ser:

- Autólogos: Cuando donante y receptor son un mismo individuo
- Singénicos: Cuando donante y receptor son dos hermanos gemelos genéticamente idénticos

-
- Alogénicos emparentados: Cuando donante y receptor son hermanos (no gemelos).
 - Alogénicos no emparentados: Cuando el donante no es familiar del receptor y se ha seleccionado a través de una búsqueda internacional de donante.

El objetivo de los trasplantes autólogos es posibilitar la administración de dosis de radioquimioterapia que superen el límite de toxicidad hematológica, para así conseguir erradicar una enfermedad neoplásica. También se ha utilizado para causar una profunda inmunosupresión con la intención de que ésta se siga de una reconstitución inmune capaz de mantener al paciente en remisión de una enfermedad autoinmune grave.

En el trasplante singénico y alogénico, se intenta sustituir el propio sistema hematopoyético enfermo por uno ajeno. En los trasplantes alogénicos, a pesar que se intenta disminuir las tasas de EICH forzando al máximo la histocompatibilidad entre donante y receptor, siempre existe la posibilidad de que aparezca esta enfermedad. Sin embargo, en algunas ocasiones, es precisamente un efecto colate-

ral de esta complicación (el denominado efecto implante contra enfermedad) el que consigue la curación del paciente. El riesgo de EICH grave se da sobre todo en los trasplantes alogénicos no emparentados, y por ello en este tipo de trasplante deben aplicarse protocolos profilácticos de inmunosupresión muy agresivos (Sierra J. 2000).

2.3.2.3. Según el tipo de acondicionamiento

Denominamos acondicionamiento al régimen radio-quimioterápico utilizado para preparar al receptor para el trasplante. Habitualmente, el objetivo del acondicionamiento es doble; por una parte inmunosuprimir al receptor para que pueda aceptar los progenitores del donante y por otra eliminar el tejido hemopoyético del receptor para que los progenitores del donante puedan “anidar” con comodidad (Burt RB y col; 1996).

A final del siglo XX se desarrolló la idea de realizar acondicionamientos poco ablativos y muy inmunosupresores para permitir el establecimiento inicial de una “quimera mixta”, es decir, la convivencia de progenitores hemato-

poyéticos de donante y receptor, y reducir así el periodo de aplasia. Este tipo de trasplante se diseñó especialmente para aquellos pacientes mayores o débiles que no podían soportar la agresividad de un acondicionamiento convencional. Por ello, este tipo de trasplante pasó a denominarse de intensidad reducida o no ablativo. En contraposición, los trasplantes con acondicionamiento intenso pasaron a denominarse trasplantes ablativos.

2.3.2.4. Tipos de trasplante aplicados en los pacientes que fueron incluidos en los trabajos relativos a esta tesis

El desarrollo de esta tesis ha sido largo, y por ello puede apreciarse en ella la evolución de la práctica del trasplante. En los trabajos que se presentan, la indicación siempre es por enfermedad hemato-oncológica, y aparecen trasplantes de médula ósea y de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica, autólogos y alogénicos (en ningún caso aparecen trasplantes singénicos, no emparentados, o de cordón umbilical, ya que su comportamiento

difiere mucho del resto) y por último, trasplantes ablativos y de intensidad reducida.

2.3.3. Principales complicaciones del trasplante

El TPH en cualquiera de sus modalidades, mantiene elevados niveles de morbi-mortalidad tóxico-infecciosa. Las principales causas de muerte en los pacientes trasplantados son las complicaciones debidas a la toxicidad del acondicionamiento (sobre todo las complicaciones infecciosas), la aparición de EICH grave (Figura 10) y las recaídas de la enfermedad de base.

Los avances en el TPH se han centrado en reducir dicha morbi-mortalidad de diversas formas. En el caso de las infecciones, ajustando la profilaxis antibiótica y antivírica, mejorando la quimioterapia antimicrobiana y las combinaciones antimicrobianas de tratamiento y reduciendo los periodos de neutropenia mediante el uso de factores de crecimiento. Asimismo se ha intentado disminuir la toxicidad global del acondicionamiento mediante el uso de regímenes de intensidad reducida.



Figura 10. Paciente con afectación cutánea por EICH.

Por último, se ha intentado disminuir la frecuencia de aparición y gravedad del EICH maximizando la compatibilidad donante – receptor mediante técnicas moleculares de tipaje HLA. También ha sido fundamental en todos los aspectos, la mejora de los tratamientos de soporte (transfusiones, control de la mucositis, medidas de aislamiento y asepsia, etc).

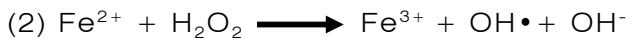
El desarrollo de agentes antibacterianos y antifúngicos dirigidos a tratar pacientes inmunocomprometidos ha sido tan espectacular que la mayor parte de la estrategia de lucha contra la infección se ha basado en ellos. Desgraciadamente, la aparición de resistencias cada vez más difíciles de soslayar fuerza a la investigación exhaustiva de los mecanismos microbianos de resistencia y también a desempolvar antiguas hipótesis de mecanismos no específicos contra la infección. En este contexto se enmarca la llamada “capacidad bacteriostática del suero” donde, como se verá, el hierro juega un papel fundamental.

2.4. HIERRO Y TOXICIDAD

2.4.1. El hierro como catalizador de radicales libres

El hierro es un importante catalizador biológico. Esto es así porque el átomo de Fe^{2+} dispone en su corteza electrónica externa de 5 orbitales atómicos d desapareados, es decir, que ocupan un orbital "d" en solitario. Este ión tiende a estabilizar su corteza electrónica y por ello tiene una gran tendencia a ceder un electrón y pasar a Fe^{3+} con tres electrones desapareados en la capa externa de orbitales "d", compartiendo dichos orbitales con otros elementos (Figura 11). Esta especial configuración le permite reducir con facilidad elementos oxidantes como el oxígeno y participar en múltiples reacciones químicas de oxidación-reducción (Halliwell y Gutteridge, 1990). Este comportamiento químico, que resulta esencial en las funciones fisiológicas del hierro, puede suponer un grave problema cuando el hierro actúa sin control, dado que se favorecen reacciones que tienden a la aparición de compuestos químicos intermediarios reducidos, portadores de electrones "desapareados"

(que ocupan solos un orbital atómico o molecular) altamente tóxicos, denominados radicales libres. En concreto, la presencia de hierro libre catalítico es capaz de mediar la producción de radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) a partir de la presencia de radical superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Wardman y Candelas, 1996) por la vía de las reacciones de Haber-Weiss⁽¹⁾ y Fenton⁽²⁾:



El factor limitante para la segunda reacción es la disponibilidad de iones ferrosos. La presencia de éstos depende de la presencia de agentes reductores capaces de transformar el Fe^{3+} en Fe^{2+} , como el propio radical superóxido (O_2^-).

El radical hidroxilo es el más tóxico de los radicales libres (Pré, 1991). Por ello no es extraño que a lo largo de la evolución hayan aparecido tres sistemas enzimáticos que tienen por objetivo disminuir al máximo la presencia de

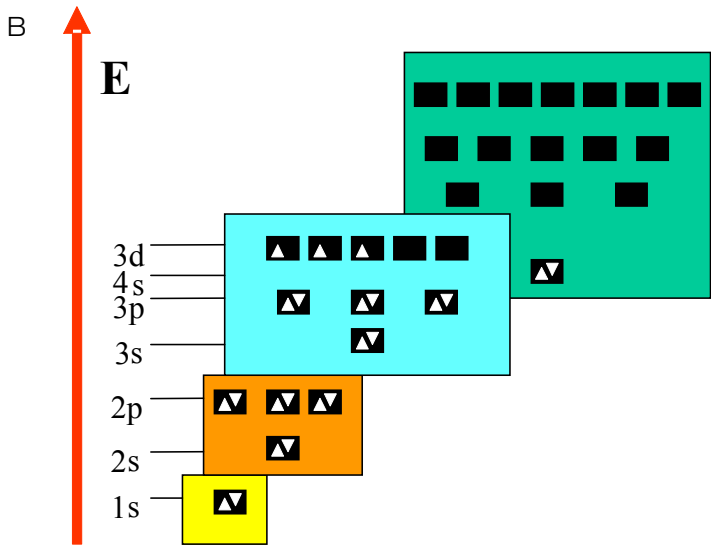
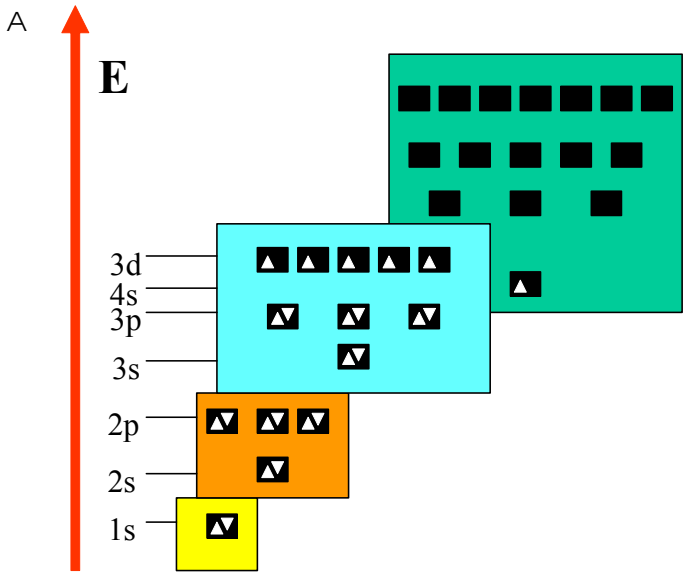


Figura 11 : Estructura electrónica del Fe^{2+} (A) y del Fe^{3+} (B). Los triángulos representan electrones ocupando orbitales en posiciones de energía creciente.

los metabolitos H_2O_2 y O_2^- , metabolitos que con la participación del hierro constituyen el sustrato para la producción de radical hidroxilo. Estos sistemas protectores antiradical son: el sistema de la superóxido dismutasa para el O_2^- y los sistemas de la glutathion peroxidasa y catalasa para el H_2O_2 . La presencia de hierro catalítico libre puede promover la producción de $\text{OH}\cdot$ en presencia de trazas de sus sustratos. Es obvia pues la necesidad de impedir la aparición de hierro libre.

El hierro no solo es capaz de catalizar la generación de radicales hidroxilo, también interviene en la peroxidación lipídica aumentando la velocidad de oxidación de lípidos a través de la conversión de los hidroperóxidos lipídicos en radicales alcoxilos y peroxilos (Papanikolaou y Pantopoulos, 2005).

2.4.2. **Acción tóxica del hierro sobre los parénquimas. Hemocromatosis**

La acción tóxica del hierro sobre los tejidos y órganos es patente en los pacientes con hemocromatosis hereditaria (HH) y en aquellos

con hemosiderosis transfusional. En la hemocromatosis hereditaria, una mutación genética provoca un incremento en la absorción intestinal de hierro. Como no existen mecanismos fisiológicos de excreción de este metal, el hierro se acumula en los tejidos ejerciendo al final su acción tóxica. Las complicaciones más habituales en esta patología son la fibrosis – cirrosis hepática, la diabetes y la miocardiopatía dilatada (Altes A, 2004). Dentro de las alteraciones genéticas que se asocian a hemocromatosis la forma más común es la de tipo 1, que se asocia a mutaciones del gen denominado HFE. Con el descubrimiento de las nuevas proteínas implicadas en el metabolismo del hierro, han ido identificándose nuevas mutaciones que han dado lugar a nuevas hemocromatosis de menor prevalencia (Tabla 1).

En la hemosiderosis transfusional, la transfusión crónica de concentrados de hematíes necesaria para tratar anemias crónicas como la talasemia mayor o los síndromes mielodisplásicos, provoca un cúmulo progresivo de hierro transfusional (0.2 gr por concentrado transfundido), provocando un proceso patoló-

Tabla 1: Características distintivas de los diversos tipos de hemocromatosis hereditaria

TIPO HEMOCROMATOSIS	GEN	PROTEÍNA	LOCUS
Tipo 1	HFE	HFE	6p21.3
Tipo 2A	HAMP	Hepcidina	19q13
Tipo 2B	HEMOJUVELINA	Hemojuvelina	1q21
Tipo 3	TFR2	Receptor 2 Tf	7q22
Tipo 4	SLC40A1	Ferroportina	2q32

gico similar al explicado para la hemocromatosis hereditaria. Sin embargo, en este tipo de hemocromatosis el órgano que suele resultar más dañado es el corazón, seguido por el hígado y el páncreas.

En ambas patologías la causa del daño tisular no es otra que la propia sobrecarga férrica y el daño radicalario que ésta genera. La eliminación del exceso de hierro, ya sea mediante el tratamiento depletivo de hierro con flebotomias (en el caso de la HH) y el tratamiento quelante en las hemocromatosis secundarias

consiguen detener el avance de las complicaciones patológicas. Además se ha identificado al hierro no unido a transferrina como el agente causal del daño tisular en estas patologías. Debe suponerse pues que el daño tisular se producirá en cualquier caso que exista hierro no unido a transferrina, sea cual sea la causa de dicha sobrecarga férrica.

2.5. **H**IERRO E INFECCIÓN

2.5.1. **H**istoria del estudio de la relación entre hierro e infección

Schade y Caroline, hace más de 60 años, descubrieron que las proteínas con afinidad específica por el hierro (presentes en la sangre y en la clara de los huevos) podían inhibir el crecimiento de algunas bacterias (Schade and Carolina, 1944,1946). Estos autores concluyeron que estas proteínas se unen con tanta afinidad al hierro que imposibilitan que muchas bacterias puedan obtener suficiente cantidad de metal del medio para crecer. De

hecho, si se añadía hierro al medio se superaba esta capacidad bacteriostática de la sangre. Las investigaciones sobre este factor sanguíneo condujeron a la identificación de la proteína transferrina. Sin embargo, las investigaciones relativas a su función como transportador del hierro propiciaron el olvido de su capacidad bacteriostática. Una década después se descubrió que los animales a los que se inyecta hierro (en diversas formas) eran mucho más susceptibles a sufrir infección “in vivo” que los animales control. Dicha susceptibilidad a la infección ha sido bien demostrada para diversos organismos (Tabla 2).

Trabajos posteriores permitieron establecer la capacidad de los compuestos del hierro y sólo de éstos para revertir “in vitro” el efecto antibacteriano de los fluidos corporales (Bullen, 1981; Finkelstein, Sciortino y McIntosh, 1983; Griffiths, 1983; Weinberg, 1984; Bullen et al, 1991, 1992; Bullen, Ward and Rogers 1991; Weinberg and Weinberg, 1995; Ward, Bullen and Rogers, 1996). No obstante, a nadie se le escapa que muchos microorganismos son capaces de producir infección sin necesidad de una fuente adicional de hierro. Ello es

Tabla 2: Ejemplos de bacterias cuya virulencia en infección experimental se exagera con la adición de compuestos de hierro inyectados.

<i>Aeromonas hydrophila</i>	Miles, Khimji y Maskell, 1979
<i>Clostridium perfringens</i>	Bullen, Cushnie y Rogers, 1967
<i>Cl. oedematiens</i>	Miles, Khimji y Maskell, 1979
<i>Corynebacterium renale</i>	Henderson, Kadis y Chapman, 1978
<i>Escherichia coli</i>	Bullen, Leigh y Rogers, 1968
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Miles, Khimji y Maskell, 1979
<i>Listeria monocytogenes</i>	Sword. 1966
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Paine and Finkelstein, 1975
<i>N. meningitidis</i>	Calver, Kenny y Lavergne, 1976
<i>Pasteurella multocida</i>	Bullen y col. 1968
<i>P. haemolytica</i>	Chengappa, 1983
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Forsberg y Bullen, 1972
<i>Salmonella typhimurium</i>	Kaye, Merselis y Hook, 1965
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gladstone y Walton, 1971
<i>Vibrio anguillarum</i>	Crosa, 1980
<i>V. cholerae</i>	Ford y Hayhoe, 1976
<i>V. vulnificus</i>	Wright, Simpson y Oliver, 1981
<i>Yersinia pestis</i>	Jackson y Burrows, 1956
<i>Y. enterocolitica</i>	Robins – Browne y Prpic, 1985

debido a que muchos agentes bacterianos y fúngicos disponen de sistemas específicos de captación de hierro del huésped (y de hecho éste es un mecanismo de resistencia-virulencia). De todos modos, parece lógico pensar que las infecciones pueden ser más frecuentes en situación de sobrecarga-descontrol de los depósitos orgánicos de hierro.

2.5.2. La “disponibilidad” del hierro

A pesar que tenemos hierro en cantidades apreciables en todos los fluidos vitales, la cantidad de hierro no unido a proteínas disponible para los microorganismos es insignificante. La mayor parte del hierro permanece intracelular, unido a ferritina, hemosiderina o al grupo hemo. Por otra parte, el hierro presente en los fluidos extracelulares permanece unido a proteínas con alta afinidad para el hierro, fundamentalmente la transferrina en el suero y la linfa y una proteína relacionada denominada lactoferrina en las secreciones externas y la leche (Aisen 1980; Bezkorovainy, 1980; Morgan, 1981; Crichton y Charloteaux-Wauters, 1987; Crichton, 1990;

de Jong, van Dijk y van Eijk, 1990; Andrews y col. 1992; Baker y Lindley, 1992; Williams y Griffiths, 1992; Huisman, 1993; Giardina y col 1995; Harrison y Arosio, 1996). Estas proteínas tiene constantes de asociación de aproximadamente 10^{36} y se hallan normalmente parcialmente saturadas (por ejemplo, la transferrina habitualmente en un 30-40%). Puede calcularse que la cantidad de hierro libre en equilibrio con el hierro unido a transferrina es en situación normal de 10^{-18} M, o sea, virtualmente de 0 (Bullen, Rogers y Griffiths, 1978).

El hierro se halla permanentemente unido a proteínas en todos los sistemas biológicos. Una razón inmediata para ello es que el hierro férrico, en situación fisiológica, tiende a oxidar, hidrolizar y polimerizar formando compuestos insolubles como el hidróxido férrico y los polímeros de óxido-hidróxido (May y Williams, 1980). Se ha calculado que toda cantidad de Fe^{3+} superior a 2.5×10^{-18} M precipitará en forma de hidróxidos férricos insolubles. Además, el Fe^{2+} que sería más soluble que el Fe^{3+} es rápidamente oxidado a Fe^{3+} en el ambiente extracelular de la mayor

parte de células aeróbicas. Esta situación se reproduce en la corteza terrestre, donde el hierro es relativamente abundante pero inutilizable por las criaturas vivas puesto que se presenta en forma de compuestos insolubles. Durante la evolución biológica, este problema primordial se ha paliado mediante la síntesis por los microorganismos de agentes químicos (sideróforos) que consiguen unirse al hierro, disolverlo y permitir su ingreso al interior del organismo. Algunas plantas sintetizan agentes quelantes de bajo peso molecular (citrato, malato) que pueden ser secretados por la raíz de las plantas con el fin de solubilizar el hierro del suelo y hacerlo aprovechable. De hecho, algunas rizobacterias con capacidad colonizadora de raíces pueden incrementar de forma significativa la producción agrícola de patatas, caña de azúcar y otros cultivos que colonizan mediante la secreción de sideróforos que se unen firmemente al hierro e impiden que otros microorganismos puedan utilizarlo. (Kloepper y col, 1980, Schroth y Hancock, 1982).

2.5.3. Hipoferremia de infección

Recientes conocimientos relacionados con la absorción del hierro nos ayudan a entender hasta qué punto el control de la cantidad de hierro disponible es usado por los mamíferos para evitar la infección (Ganz T, 2003; Robson KJ, 2004; Pietrangelo A, 2004). Desde hace muchos años se conoce la llamada “hipoferremia de infección”. Cuando el organismo de un mamífero sufre una infección, se produce una cascada de eventos bioquímicos que se traducen en una baja saturación de la transferrina por hierro. Este fenómeno puede reproducirse inyectando pequeñas cantidades de endotoxina bacteriana o interleukinas 1 o 6 (IL-1, IL6). Se demuestra que la endotoxina bacteriana y la IL-1 son capaces de estimular la síntesis de IL-6 por el sistema mononuclear fagocítico. La IL-6 producida estimulará la producción hepática de un péptido denominado hepcidina y que ha resultado ser el principal regulador fisiológico de la absorción de hierro inorgánico. La hepcidina interacciona en las células de la mucosa intestinal y en la membrana de los macrófagos con una proteína denominada ferroportina, encargada

de bombear hierro desde la luz intestinal al plasma (en el caso de la mucosa intestinal) y del interior de los macrófagos al eritrón. La interacción de la hepcidina con la proteína ferroportina conlleva la destrucción de esta última, y esto tiene como consecuencia el freno de la absorción de hierro a nivel intestinal y el bloqueo del hierro macrofágico al eritrón (Figura 12). Las dos acciones disminuyen la cantidad de hierro unido a transferrina y, con ello, el transporte de hierro por el plasma. Éste representa un mecanismo eficiente a una posible diseminación hematógena de la infección.

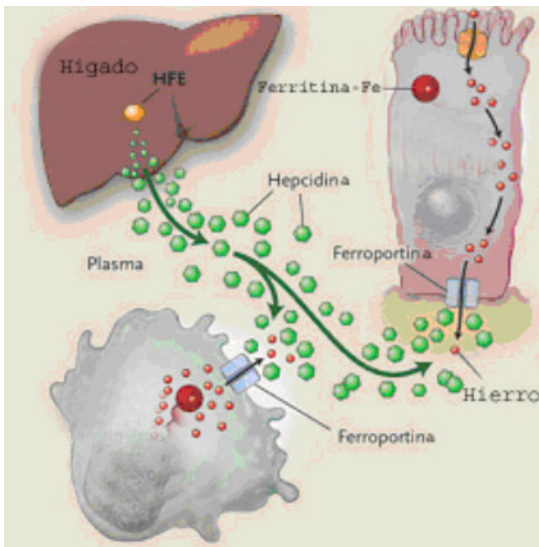


Figura 12: Diversos estímulos provocan la síntesis y liberación de la hepcidina hepática. Ésta interacciona con la ferroportina presente en la membrana basolateral de los enterocitos y en la membrana plasmática de los macrófagos, provocando su eliminación y frenando la absorción del hierro intestinal y la salida del hierro macrofágico. Esquema modificado de Pietrangelo A, 2004.

2.5.4. Mecanismos microbianos de adquisición de hierro

A pesar de la bajísima concentración de hierro libre extracelular y de los mecanismos de respuesta a la infección en que esta concentración todavía es menor, está claro que los gérmenes patógenos consiguen hierro para proliferar. Los sistemas de adquisición de hierro han sido mucho más estudiados en bacterias que en hongos o protozoos, aunque se supone que los sistemas utilizados son parecidos. Básicamente se han definido cinco sistemas de adquisición microbiana del hierro que detallamos a continuación

- Destrucción proteolítica de las glicoproteínas del huésped que se unen al hierro, arrancando literalmente el hierro de su transportador. Este mecanismo es poco utilizado, aunque algunas cepas de Bacteroides pueden hacerlo (Carlsson, Hofling y Sundqvist, 1984).
- Reducción del Fe^{3+} unido a transferrina a Fe^{2+} , con la liberación consecuente del hierro y su utilización por la bacteria. Este

parece ser un mecanismo usado por *Listeria monocytogenes* que secreta un factor soluble altamente reductor con capacidad de realizar esta acción (Cowart and Foster 1985).

- Producción de compuestos de bajo peso molecular, quelantes del hierro, conocidos como sideróforos, que son capaces de “arrancar” el hierro de la transferrina para ser posteriormente captados por receptores específicos de la bacteria. Este es el sistema mejor comprendido y más estudiado, aunque se desconoce si también es el más frecuentemente utilizado “in vivo” (Crosa, 1989; Weinberg, 1989; Griffiths, 1991; Wooldridge y Williams, 1993; Cornelissen y Sparling, 1994; Neilands, 1995).
- Interacción directa de la transferrina unida a hierro con receptores bacterianos “análogos” al receptor de transferrina presente en los reticulocitos. Aunque se conoce poco sobre este mecanismo, que es muy huésped-específico, cada vez parece más evidente que es muy frecuente entre los patógenos que afectan a hombres y

animales superiores (Williams y Griffiths, 1992; Cornelissen y Sparling, 1994; Gray-Owen y Schryvers, 1996).

- Algunas bacterias tienen la capacidad de extraer el hierro directamente de la hemoglobina y los compuestos hemo si consiguen entrar en contacto directo con ellos.

En la Tabla 3 se muestra una relación de bacterias que utilizan los tres últimos mecanismos descritos en esta clasificación.

2.6. SOBRECARGA FÉRRICA Y TPH

2.6.1. Sideremia, saturación de transferrina y TPH

Hunter y col publicaron en 1984 el primer artículo en el que se describe una relación entre un parámetro sugestivo de sobrecarga férrica y un incremento en la mortalidad post-trasplante alogénico de médula ósea (Hunter RL, 1984). En aquel trabajo se observó que 11 de 12 pacientes sometidos a trasplante hemopoyético por leucemia aguda presentaban niveles elevados de saturación de transferrina

Tabla 3: Ejemplos de mecanismos bacterianos de adquisición de hierro

Uso de sideróforos:

<i>Aeromonas species</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
<i>Bordetella species</i>	<i>Pseudomonas species</i>
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Salmonella species</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella species</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Mycobacteria</i>	<i>Vibrio species</i>

Expresión de receptores de transferrina:

<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Branhamella catarrhalis</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Haemophilus somnus</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Pasteurella haemolytica</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

Uso de compuestos hemo:

<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>Pophyromonas gingivalis</i>
<i>Aeromonas species</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Haemophilus species</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Vibrio species</i>
<i>Neisseria species</i>	<i>Yersinia species</i>
<i>Pasteurella species</i>	

pre-trasplante. Por otra parte, los 7 pacientes que mantuvieron elevado el índice de saturación durante todo el trasplante presentaron infección. Por último, tres pacientes que mantuvieron una saturación de transferrina elevada a pesar de sufrir una infección murieron.

Estos hallazgos permanecieron en el olvido y no se volvió a investigar el metabolismo férrico durante el TPH hasta 10 años más tarde. En 1995 se estudió el suero de 32 pacientes en tratamiento con trasplante autólogo. Las muestras estudiadas se obtuvieron tres y dos días antes de la infusión de progenitores (días -3 y -2). Los autores observaron que en esos días se produce una elevación reproducible en la sideremia (Figura 13). Dicha elevación se mantuvo hasta aproximadamente los días +4 y +5 post infusión (Gordon LI, 1995).

Posteriormente dos grupos independientes observaron que algunos pacientes con leucemia aguda y bajo tratamiento con quimioterapia mieloablativa presentaban niveles apreciables de hierro sérico no unido a transferrina (NTBI) cuando los pacientes presentaban sobrecarga férrica (Carminc TC, 1995; Bradley SJ, 1997). Estas observaciones fueron confir-

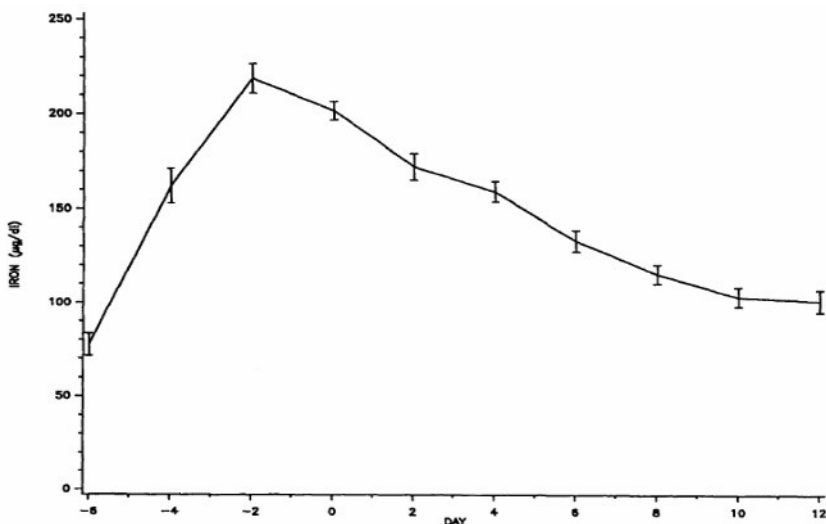


Figura 13: Evolución de la sideremia durante el TPH. Reproducido de Gordon LI, 1995

madas en el contexto del TPH (Durken M, 1997) al estudiar la presencia de NTBI en un grupo de 40 pacientes (24 alogénicos, 15 autólogos y un singénico) desde el día 0 y hasta 2 semanas post-trasplante hematopoyético. La mayoría de los pacientes presentaban niveles de hierro no unido a transferrina significativos. Los mismos autores también observaron que la práctica totalidad de pacientes con hierro no unido a transferrina detectable presentaban niveles de saturación de transferrina superiores al 70-80%. (Figura 14)

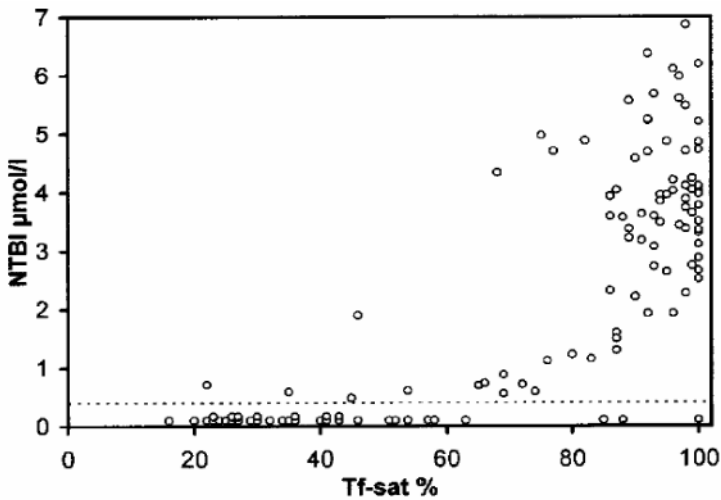
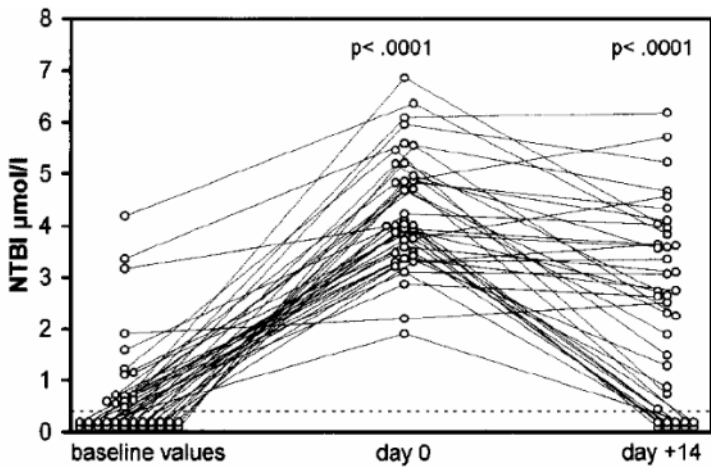


Figura 14: Durante el proceso de trasplante hemopoyético, los pacientes experimentan un espectacular incremento de las cifras de hierro no unido a transferrina, incremento que se da fundamentalmente en aquellos pacientes con índice de saturación de la transferrina superior al 70-80%. Obtenido de Dürken M y col, 1997.

2.6.2.

Concentración hepática de hierro en pacientes muertos durante el TPH

El grupo de Strasser en Seattle fue el primero en estudiar la concentración hepática de hierro de los pacientes trasplantados. En 1998 (Strasser SI, 1998) analizaron la concentración hepática de hierro de 10 pacientes que fallecieron entre los días 50 y 100 después de recibir un trasplante alogénico o singénico de médula ósea. Una conclusión relevante del trabajo fue que la concentración mediana de hierro hepático entre el grupo de pacientes fallecidos era de 4.307 μg de hierro por gramo de hígado desecado, con un rango de 1.832 – 13.120 $\mu\text{g/g}$. Esta cifra era muy superior a las cifras que se aceptan como “normales” (530-900 $\mu\text{g/g}$) y por tanto quedaba demostrado que, en general, los pacientes que fallecen tras trasplante alogénico tienen una importantísima sobrecarga férrica (Figura 15). De hecho, todos los pacientes estudiados tenían concentraciones de hierro similares a la de los pacientes con hemocromatosis hereditaria grave. Además, los autores establecieron un nuevo parámetro morfológico de medida del hierro en frotis de mielogramas con buena

correlación con la concentración hepática de hierro (método que ha sido usado en estudios posteriores).

Table 2 Analysis of liver and marrow iron by biochemical and morphometric methods

<i>UPN</i>	<i>Biochemical hepatic iron content ($\mu\text{g Fe/g dry wt}$)</i>	<i>Biochemical hepatic iron index ($\mu\text{mol Fe/g/age (years)}$)</i>
8967	7844	4.71
9099	3813	3.92
9303	4512	8.14
9381	6439	5.33
9405	2355	1.23
9619	12505	3.79
10095	1832	0.76
10273	2812	1.31
10283	4101	1.44
10393	13120	5.20
Median value	4306.5	3.85

*Expressed as a percentage of marrow cellular area staining for iron.

Figura 15 : Resultados de concentración de hierro hepático obtenidos por Strasser en su serie de diez pacientes tras fallecer después de un TPH. (Obtenido de Strasser, 1998).

2.6.3. Caracterización de la cinética de la hipersaturación de transferrina y aparición de hierro no unido a transferrina en el TPH

Finalmente, un nuevo estudio biológico caracterizó mejor la cinética del incremento de saturación de transferrina y aparición de hierro no unido a transferrina durante el acondicionamiento por trasplante alogénico (Sahlstedt

L, 2001). Se estudiaron 10 pacientes adultos de forma secuencial desde el día -10 al día +14 del trasplante con acondicionamiento uniforme (Ciclofosfamida + Radioterapia corporal total). Los autores concluyeron que el índice de saturación de transferrina alcanza un máximo en el día -4 del trasplante (99% de media) y se mantiene superior al 80% durante unos días. Los autores midieron el hierro no unido a transferrina mediante el método de la bleomicina y comprobaron que éste aparecía a niveles significativos en muchos pacientes y también experimentaba un pico en el día -4. Además se estableció que la práctica totalidad de pacientes en los que se detectaba la presencia de hierro no unido a transferrina tenían una saturación de transferrina $\geq 80\%$. En concreto, se detectó hierro no unido a transferrina en el 88% de las muestras con saturación de transferrina $\geq 80\%$, mientras que sólo se detectó en el 8% de las muestras con saturación $< 80\%$. (Figura 16)

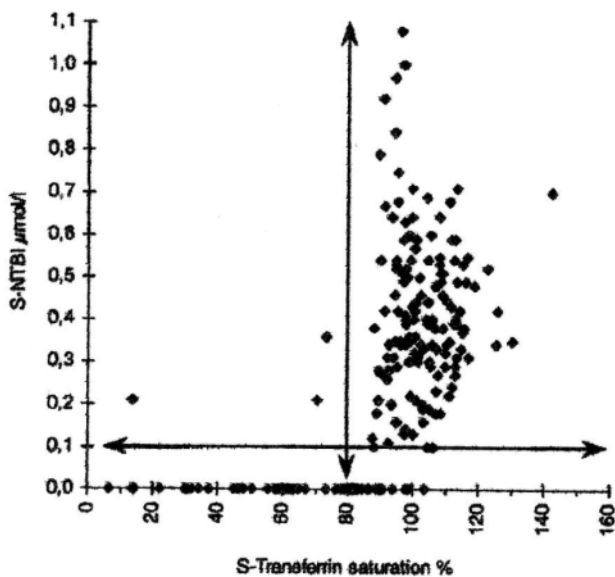
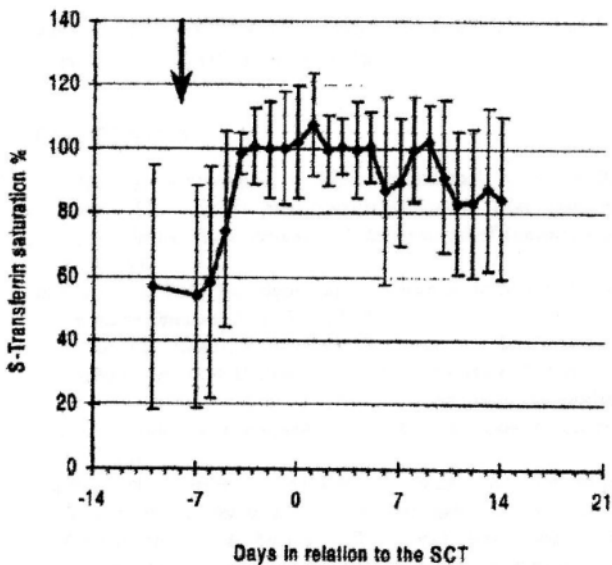


Figura 16 : El índice de saturación de transferrina experimenta un pico en el día -4 del TPH. La inmensa mayoría de los pacientes que presentan hierro no unido a transferrina durante el trasplante tienen un índice de saturación de transferrina superior al 80%. (Sahlstedt I. v col 2001)

2.6.4.

Primeros estudios clínicos relativos a la sobrecarga férrica durante el TPH

Durante el periodo 1996–2000 aparecen algunos artículos de índole clínica de interés en el estudio de la sobrecarga férrica–toxicidad y centrados en la toxicidad hepática post-trasplante tardía. En uno de ellos (Harrison P y col, 1996) 38 pacientes, trasplantados como mínimo tres años antes, fueron analizados para la infección del virus de hepatitis C, hepatitis B, elevación de AST, ferritina y presencia de hierro no unido a transferrina (mediante el método de la bleomicina). Diez pacientes presentaban niveles de AST permanentemente altos tras el trasplante. De éstos cuatro presentaban problemas clínicos que explicaban dicha alteración (hepatitis C en dos casos, hepatitis B en uno y enfermedad de injerto contra huésped crónica en el cuarto). Ninguno de estos cuatro pacientes presentaba hierro no unido a transferrina. En 4 de los restantes 6 pacientes sin causa obvia para la elevación de AST se detectó la presencia de hierro no unido a transferrina, y se concluyó que ésta podía ser la causa de la alteración hepática. En el mismo periodo, un grupo

español estudió de forma retrospectiva una cohorte de 106 pacientes que sobrevivieron más de dos años a un trasplante alogénico (Tomás JF y col, 2000). El 57.5% de los pacientes presentaban enfermedad hepática crónica. En el 47.3% de estos pacientes existía más de una causa que explicara la enfermedad hepática. La causa de enfermedad hepática más prevalente fue la sobrecarga férrica (52.4%) seguida de la hepatitis crónica (47.5%), enfermedad de injerto contra huésped crónica (37.7%), hepatitis B (6.5%), esteatohepatitis no alcohólica (4.9%), hepatitis autoinmune (4.9%) y desconocida en el 3.3% de casos. Veintitrés pacientes con sobrecarga férrica iniciaron tratamiento con flebotomías y el 91% de ellos experimentaron mejora en los parámetros de función hepática. En concreto, en los seis pacientes en los que identificó a la sobrecarga férrica como la única causa de la hepatopatía, se restablecieron completamente los parámetros bioquímicos hepáticos tras el tratamiento con flebotomías.

2.6.5. **Sobrecarga férrica, quimioterapia intensiva e infección**

Por último, en dos trabajos se especuló con la relación entre quimioterapia intensiva-trasplante, sobrecarga férrica e infección. En uno de ellos se estudiaron 74 pacientes tras quimioterapia mieloablativa (Iglesias-Osma C y col, 1995). En este trabajo se demostró que entre los 25 pacientes que desarrollaron infección fúngica confirmada (4) o posible (21), la sideremia, saturación de transferrina y ferritina eran superiores al resto y la concentración de transferrina menor, concluyendo que la sobrecarga férrica era un factor de riesgo para infección fúngica en este tipo de pacientes. En otro trabajo y tras analizar 263 trasplantes alogénicos, se identificaron 5 casos de mucormicosis invasiva (Maertens J y col, 1999). El tratamiento corticosteroide y la enfermedad de injerto contra huésped eran factores de riesgo conocidos de la enfermedad, pero los autores detectaron como dato más sorprendente del estudio que los cinco pacientes presentaban una impresionante sobrecarga férrica en comparación con un grupo control. Los autores especularon con la

posibilidad de que la sobrecarga férrica constituya un factor de riesgo para la aparición de la mucormicosis en el pacientes alotrasplantado.

2.7. HIPÓTESIS

Los pacientes que se tratan con un trasplante de progenitores hematopoyéticos han pasado previamente por múltiples ciclos de quimioterapia, por lo que han recibido múltiples transfusiones. Es lógico suponer que muchos de estos pacientes llegan al trasplante con una importante sobrecarga de hierro. Los datos expuestos hasta ahora demuestran por una parte que la sobrecarga férrica puede acarrear consecuencias tóxicas y una mayor susceptibilidad a las infecciones, y por otra que efectivamente algunos pacientes llegan al trasplante con elevación de parámetros férricos que empeoran durante el proceso de acondicionamiento.

Los trabajos presentados en esta tesis giran al entorno de la hipótesis que la sobrecarga férrica es frecuente e intensa en los pacientes

que llegan al trasplante y que puede incrementar los eventos tóxicos e infecciosos en estos pacientes, condicionando una mayor mortalidad asociada al trasplante y una menor supervivencia.

OBJETIVOS

1. Evaluar la frecuencia e intensidad de la sobrecarga bioquímica de hierro en los pacientes que llegan a un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH).
2. Seguir la evolución de los parámetros férricos durante el TPH.
3. Determinar la causa del gran incremento de la saturación de la transferrina durante el acondicionamiento del TPH.
4. Analizar si la sobrecarga férrica se asocia a eventos tóxicos infecciosos precoces durante el TPH.
5. Evaluar la frecuencia y grado de sobrecarga férrica hepática de los pacientes que mueren tras un TPH.
6. Determinar las toxicidades–infecciones mortales que se asocian con la sobrecarga férrica en el TPH .
7. Determinar si la sobrecarga férrica se asocia a una mayor mortalidad del procedimiento y una menor supervivencia global en el TPH.

JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD TEMÁTICA DE LA TESIS DOCTORAL

Los cuatro trabajos presentados en esta tesis doctoral siguen un mismo hilo argumental que gira al entorno de la hipótesis y objetivos propuestos. Todos ellos se basan en la hipótesis de que la sobrecarga de hierro puede tener consecuencias en la morbi-mortalidad del trasplante de progenitores hematopoyéticos. En algunos casos, los resultados de un trabajo inspiraron la realización del siguiente, o bien sus datos sirvieron para basar trabajos posteriores. Por ello, se presentan todos secuencialmente, tal como fueron escritos y publicados. De otro modo sería difícil seguir el razonamiento unitario propuesto en esta tesis.

RResultados y **D**Discusión

3.1. RESULTADOS

3.1.1. IRON OVERLOAD MIGHT INCREASE TRANSPLANT-RELATED MORTALITY IN HAEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION.

A. Altés, A.F. Remacha,
A. Sureda, R. Martino,
J. Briones, C. Canals,
S. Brunet, J. Sierra,
E. Gimferrer

Bone Marrow Transplantation 2002;29:987-989.



“La sobrecarga férrica puede incrementar la mortalidad relacionada con el trasplante de progenitores hematopoyéticos”

RESUMEN:

Introducción y Objetivos: A pesar de que en el momento de realizar este trabajo se sabía que para muchos pacientes presentaban elevación muy intensa de los parámetros bioquímicos de sobrecarga férrica durante la fase pre-trasplante hematopoyético, no se había eva-

luado si dicha elevación se asociaba a una mayor mortalidad del procedimiento. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar si aquellos pacientes que presentaban niveles muy elevados de ferritina sérica ($\geq 3000 \mu\text{g/l}$) en el día -7 y de saturación de transferrina ($\geq 100\%$) en el día -4 del periodo de acondicionamiento de un trasplante de progenitores hematopoyéticos mediante esquema clásico Ciclo/ICT tenían una peor supervivencia global debida a una mayor mortalidad relacionada con el trasplante que los pacientes que no presentaban valores tan elevados. Se escogió el día -7 para medir la ferritina para que no estuviera elevada debido a la inflamación generada por el propio acondicionamiento y diera así una valoración fiable de los depósitos férricos. Se escogió el día -4 para medir la saturación de transferrina porque se sabía de la literatura que éste era el día de máxima saturación durante el acondicionamiento (y por tanto posible máximo daño radicalario).

Pacientes y Métodos: En un grupo de 25 pacientes que recibieron un trasplante de progenitores hematopoyéticos acondicionado con ciclofosfamida/irradiación corporal total se

midieron de forma prospectiva los niveles de ferritina en el día -7 y de saturación de transferrina en el día -4, respectivamente. El grupo consistió en 20 hombres y 5 mujeres con una edad mediana de 40 años. Quince pacientes recibieron un autotrasplante y 10 fueron alotrasplantados. En 14 el trasplante fue de médula ósea y en 11 de progenitores de sangre periférica. Nueve de ellos tenían un diagnóstico de leucemia aguda, seis una leucemia mieloide crónica y 10 un linfoma. Trece de ellos tenían una enfermedad en fase precoz (remisión completa o primera respuesta parcial) y 12 en fase avanzada (segunda remisión parcial, primera recaída no tratada o enfermedad refractaria). Para las comparaciones entre variables categóricas se usó la prueba estadística de χ^2 , y para evaluar las diferencias entre medias en las variables continuas la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Los estudios de supervivencia univariados se evaluaron mediante la prueba de Kaplan-Meier, y los multivariados mediante regresión de Cox. La supervivencia global se evaluó desde el día 0 del trasplante hasta la muerte del paciente. La mortalidad relacio-

nada con el procedimiento se evaluó desde el día 0 del trasplante hasta la muerte sin recaída. El modelo multivariante se ajustó para las variables edad, sexo, enfermedad de base, estado de la enfermedad, fuente de los progenitores (médula ósea vs sangre periférica), tipo de trasplante (alo vs auto) y número de transfusiones recibidas. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando los valores de P eran menores de 0.05.

Resultados: El grupo de pacientes que presentaban al menos una de las alteraciones férricas previstas no difería estadísticamente en sus características clínicas del grupo de pacientes sin ninguna de dichas alteraciones. Los niveles muy elevados de ferritina y la saturación de transferrina $\geq 100\%$ se asociaron con un decremento en la supervivencia global ($P= 0.001$ y $P= 0.006$, respectivamente) y un incremento de la mortalidad relacionada con el trasplante ($P= 0.003$ y $P= 0.004$, respectivamente) en los análisis de supervivencia univariante. Las dos variables se mantuvieron significativas en los estudios estadísticos multivariantes relativos a la supervivencia global ($P= 0.03$ y 0.02 , respectivamente). En el

estudio multivariante de la mortalidad relacionada con el procedimiento, la saturación de transferrina resultó un factor predictivo independiente ($P= 0.01$) y el nivel muy elevado de ferritina sérica casi presentó significación estadística ($P= 0.06$). La mortalidad infecciosa en el grupo con intensa sobrecarga férrica era mayor que en el resto.

Como resultado colateral indicar que, mientras se constató una relación significativa entre el número de transfusiones recibidas por los pacientes y el nivel de ferritina en el día -7 , no se constató relación entre el número de transfusiones recibidas y el nivel de saturación de la transferrina en el día -4 .

Conclusiones: Este fue el primer trabajo que demostró una asociación entre niveles elevados de hierro en fase pre-trasplante y mortalidad. Los niveles muy altos de ferritina sérica en el día -7 y los niveles de saturación de transferrina $\geq 100\%$ en el día -4 del acondicionamiento se asocian con un incremento de la mortalidad global y de las muertes tóxicas post-trasplante.



Iron overload

Iron overload might increase transplant-related mortality in haematopoietic stem cell transplantation

A Altès, AF Remacha, A Sureda, R Martino, J Briones, C Canals, S Brunet, J Sierra and E Gimferrer

Haematology Department, Hospital de Sant Pau, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain

Summary:

Iron overload (IO) is associated with free radical generation and tissue damage. Our main objective was to ascertain if very high levels (VHL) of ferritin ($\geq 3000 \mu\text{g/l}$) and transferrin saturation (TS) $\geq 100\%$ during conditioning had an impact on overall survival (OS) and transplant-related mortality (TRM) after a haematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Levels of ferritin and TS were measured at days -7 and -4 , respectively, in 25 patients who underwent HSCT after CY/TBI. The group consisted of 20 men and five women with a median age of 40 years. Fifteen patients were autotransplanted and 10 allografted. Nine of them had a diagnosis of AL, six of CML and 10 of lymphoma. Thirteen of them were in early and 12 in advanced status of disease. VHL of ferritin and TS $\geq 100\%$ were associated with a decreased OS ($P = 0.001$ and $P = 0.006$, respectively) and an increased TRM ($P = 0.003$ and $P = 0.004$, respectively) in univariate survival analysis. Both variables remained significant at multivariate analysis for OS ($P = 0.03$ and 0.02 , respectively) and TS was an independent factor for TRM ($P = 0.01$). Ferritin was very close to achieving statistical significance for TRM ($P = 0.06$) in multivariate analysis. In conclusion, VHL of ferritin and TS $\geq 100\%$ at conditioning are associated with an increase in toxic deaths after transplant.

Bone Marrow Transplantation (2002) 29, 987–989. DOI: 10.1038/sj/bmt/1703570

Keywords: iron; transferrin saturation; ferritin; survival; TRM; HSCT

Iron overload (IO) is associated with free radical production and tissue damage in different diseases such as genetic haemochromatosis and secondary IO.^{1,2} IO may be present among patients who undergo haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) due to prior blood transfusions. Pre-transplant iron status may be evaluated measuring ferritin levels pre-conditioning; that is a time when ferritin is

still neither increased as an acute phase reactant nor influenced by liver toxicity secondary to chemo-radiotherapy. Moreover, transferrin saturation (TS) increases during chemo-radiotherapy, often reaching indexes of over 80% and producing non-transferrin-bound iron (NTBI).^{3,4} TS might inform us about the potentially toxic effect of free iron, without any protein control, produced during conditioning. It is likely that an IO status pre-conditioning with an elevated TS during this procedure for HSCT may increase the toxic effects of chemo-radiotherapy.⁵ This could cause an increase in transplant-related mortality (TRM) and a subsequent decrease in overall survival (OS). The aim of this study was to determine whether a very high level of ferritin pre-conditioning and/or a full TS during CY-TBI were independent risk factors for TRM and OS.

Patients and methods

Twenty-five consecutive patients who underwent HSCT with CY/TBI were prospectively enrolled in the study. All patients were conditioned with cyclophosphamide 60 mg/kg once daily i.v. on days -6 and -5 (total dose 120 mg/kg) and TBI 6×2 Gy from days -3 to -1 . GVHD prophylaxis in allogeneic HSCT consisted of i.v. cyclosporin and a short course of methotrexate. Ferritin level and TS were measured at days -7 (pre-conditioning) and -4 (during conditioning), respectively, by commercial immunoassays. We considered very high levels (VHL) of ferritin and TS as $\geq 3000 \mu\text{g/l}$ and $\geq 100\%$, respectively. Additional variables registered for analysis were age, sex, baseline disease, status of disease (early vs advanced in cases of ≥ 2 CR or ≥ 2 PR and refractory disease), stem cell source (peripheral blood vs bone marrow), transplant type (allo vs auto) and number of blood units transfused prior to transplant. Differences between categorical variables were measured by the chi-square test, and differences between means in continuous variables with the Mann-Whitney U test. Kaplan-Meier and log-rank univariate comparisons were used to evaluate OS and TRM in univariate survival analysis. Cox regression was used in survival multivariate analysis. Results were considered as statistically significant when P values were less than 0.05.

Correspondence: Dr A Altès, Servei d'Hematologia Clínica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni M^o Claret 167, 08025 Barcelona, Spain
Received 16 January 2002; accepted 18 March 2002

Results

The clinical characteristics of the 25 patients are summarized in Table 1. The source of the graft was peripheral blood in 11 patients and bone marrow in 14. No statistically significant differences in distribution of clinical parameters were found between patients with and without IO.

Four patients presented a VHL of ferritin prior to the conditioning regimen, and 11 a high TS during the procedure. The levels of ferritin correlated with the number of previous red cell transfusions ($P = 0.002$), but a statistical relation was not observed between TS and the number of previous transfusions or between TS and ferritin levels. VHL of ferritin at day -7 and TS $\geq 100\%$ at day -4 were associated with a decreased OS ($P = 0.001$ and $P = 0.006$, respectively) and an increased TRM ($P = 0.003$ and $P = 0.004$, respectively) in univariate survival analysis. An additive effect of both variables can be seen in Figure 1. The median time from HSCT to toxic death was 2.8 months (range 0.3–34) in the IO group (with at least one increased iron parameter) and 38 months (range 0.4–47) in the remaining patients.

Both variables remained significant at multivariate analysis for OS (RR 4.7, CI 95% 1.2–18.6, $P = 0.03$ and RR 3.5, CI 95% 1.2–10.5, $P = 0.02$, respectively), and TS at day -4 was also an independent prognostic factor for TRM (RR 6.7, CI 95% 1.5–29.9, $P = 0.01$). Moreover, ferritin at day -7 was very close to achieving statistical significance (RR 5, CI 95% 0.9–26.8, $P = 0.06$). This increase of TRM was related with a high infectious mortality. Seventy-five % of patients died with serious infection in the VHL of ferritin group at day -7 vs only 19% in the other group ($P = 0.05$). The same phenomenon reproduced with high TS at day -4 (55% vs 7%, $P = 0.01$). Among allo-transplanted patients, 2/6 developed acute GVHD grade III–IV in the IO group, and 1/4 in the non-IO patients.

Discussion

The first requirement for observing the pathological consequences of IO is to have patients with this metabolic disturbance. Some previous literature anticipated that IO may be usual in bone marrow recipients, and probably more frequent in those patients who died between 50 and 100 days after transplant.⁶ In the 25 patient group the prevalence of severe iron disturbances was very high, because four patients had a basal ferritin level above 3000 $\mu\text{g/l}$ and 11 a TS $\geq 100\%$ during conditioning. The median number of packed red cells transfused prior to transplant in these 25 patients was 8 (range 0–44), and a positive correlation existed between the number of packed red cells transfused and pre-transplant ferritin levels. Nevertheless, TS during conditioning did not correlate with prior transfusions or with ferritin levels and high TS seems to have a different origin and probably could measure other aspects of iron toxicity. TS increase has three possible explanations: a decrease in transferrin due to hepatic toxicity, stored iron leaking from injured liver to blood and, finally, a suppression of erythropoietic activity during treatment.³ It has recently been demonstrated⁴ that patients who underwent HSCT and were conditioned with CY-TBI experienced a marked increase in TS with a peak on day -4. According to the same authors, non-transferrin-bound iron (NTBI) was detected in almost all patients when TS exceeded 80%. Although we did not directly measure NTBI in our patients, it is likely that all with more than 100% TS had NTBI, and pathological consequences of high TS could be mediated by the presence of free iron in tissues.

In univariate survival analysis, VHL of ferritin and TS dramatically increase TRM and decrease OS, and these effects are mainly due to infectious mortality. Multivariate analysis maintains the significance of both variables for OS and TRM ($P = 0.06$ for ferritin and TRM). It is especially

Table 1 Clinical characteristics of patients

	Without IO ^a	With IO ^a	All patients
No. patients	13	12	25
Age ($P = 0.4$) median (range)	38 (18–56)	42 (17–59)	40 (17–59)
Gender ($P = 0.3$)			
Male	9	11	20
Female	4	1	5
Underlying disease ($P = 0.7$)			
Acute leukaemia	4	5	9
Chronic myeloid leukaemia	4	2	6
Malignant lymphoma	5	5	10
Disease status ($P = 0.7$)			
1st CR	2	3	5
2nd CR	1	3	4
1st PR	3	2	5
2nd PR	3	0	3
Non-treated 1st relapse	2	1	3
Refractory disease	2	3	5
Time from diagnosis to HSCT (in months) median (range)	11 (5–76)	12 (3–50)	12 (3–76)
Transplant type ($P = 0.4$)			
Autotransplants	9	6	15
Allo-transplants	4	6	10

^aIO refers to patients with at least one increased iron parameter (ferritin level $\geq 3000 \mu\text{g/l}$ at day -7 or TS $\geq 100\%$ on day -4). Statistical differences between groups were not significant in any case.

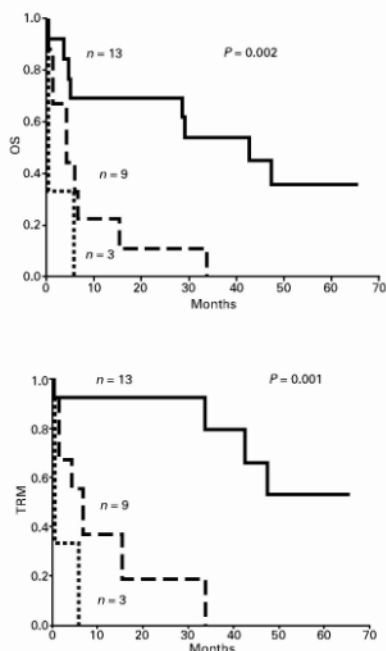


Figure 1 Kaplan-Meier estimates of overall survival (above) and TRM (below) in 25 patients after progenitor cell transplantation according to iron overload parameters. Continuous line represents patients without significantly altered iron parameters, segmented line, patients with only one altered parameter (ferritin level $\geq 3000 \mu\text{g/l}$ at day -7 or TS $\geq 100\%$ on day -4), and dotted line represents patients with both altered parameters.

interesting that the multivariate analysis was controlled by previous blood transfusions and other relevant clinical characteristics of patients. This demonstrates that these results are not simply related to a more severe disease or more severe toxicity. Ferritin and TS act as independent predictive factors influencing TRM and OS.

Iron in excess acts as a free radical catalyst of Fenton's reaction,⁷ causing toxicity and tissue damage. Mucositis and liver injury are common after HSCT and can be partly mediated by NTBI during cytotoxic chemoradiotherapy, as has been observed in children undergoing chemotherapy for ALL.⁸ In fact, IO has been identified as a cause of serious liver toxicity in the bone marrow transplant setting.⁹ Hyperferritaemia can predispose to bacterial and fungal infections.¹⁰ Increased TS and ferritin are proven risk factors for the development of systemic fungal infections in patients with haematological malignancies,¹¹ and, accordingly, patients submitted to liver transplant caused by haemo-

chromatosis are at a greater risk of dying from fungal infections than patients without iron overload submitted to the same transplant type.¹² An increase in some late fungal infections, specially mucormycosis, have been reported in iron loaded patients after HSCT.¹³

Further studies to confirm our findings are mandatory. If these results are reproduced, pre-transplant strategies to decrease iron overload¹⁴ could be proposed to decrease TRM and improve survival.

References

- Hershko C, Graham G, Bates GW, Rachmilewitz EA. Non-specific serum iron in thalassaemia: an abnormal serum iron fraction of potential toxicity. *Br J Haematol* 1978; **40**: 255-263.
- Franchini M, Gandini G, Gironcoli M et al. Safety and efficacy of subcutaneous bolus injection of deferoxamine in adult patients with iron overload. *Blood* 2000; **95**: 2776-2779.
- Bradley SJ, Gosriwita I, Srichairatanakool S et al. Non-transferrin-bound iron induced by myeloablative chemotherapy. *Br J Haematol* 1997; **99**: 337-343.
- Sahlstedt L, Ebeling F, Bonsdorff L et al. Non-transferrin-bound iron during allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2001; **113**: 836-838.
- Gordon LI, Brown SG, Tallman MS et al. Sequential changes in serum iron and ferritin in patients undergoing high-dose chemotherapy and radiation with autologous bone marrow transplantation: possible implications for treatment related toxicity. *Free Rad Biol Med* 1995; **18**: 383-389.
- Strasser SI, Kowdley KV, Sale GE, McDonald GB. Iron overload in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1998; **22**: 167-173.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; **119**: 598-620.
- Carmine TC, Evans P, Bruchelt G et al. Presence of iron catalytic for free radical reactions in patients undergoing chemotherapy: implications for therapeutic management. *Cancer Lett* 1995; **94**: 219-226.
- Tomás JF, Pinilla I, Garca-Buey ML et al. Long-term liver dysfunction after allogeneic bone marrow transplantation: clinical features and course in 61 patients. *Bone Marrow Transplant* 2000; **26**: 649-655.
- Bullen JJ. The significance of iron in infection. *Rev Infect Dis* 1981; **3**: 1127-1138.
- Iglesias-Osma C, Gonzalez-Villarón L, San Miguel JF et al. Iron metabolism and fungal infections in patients with haematological malignancies. *J Clin Pathol* 1995; **48**: 223-225.
- Brandhagen DJ, Alvarez W, Therau TM et al. Iron overload in cirrhosis-HFE genotypes and outcome after liver transplantation. *Hepatology* 2000; **31**: 456-460.
- Maertens J, Demuyneck H, Verbeke EK et al. Mucormycosis in allogeneic bone marrow transplant recipients: report of five cases and review of the role of iron overload in the pathogenesis. *Bone Marrow Transplant* 1999; **24**: 307-312.
- de la Serna J, Bornstein R, Garcia-Bueno MJ, Lahuerta-Palacios JJ. Iron depletion by phlebotomy with recombinant erythropoietin prior to allogeneic transplantation to prevent liver toxicity. *Bone Marrow Transplant* 1999; **23**: 95-97.

3.1.2.

FREQUENT SEVERE LIVER IRON OVERLOAD AFTER STEM CELL TRANSPLANTATION AND ITS POSSIBLE ASSOCIATION WITH INVASIVE ASPERGILLOSIS

*A. Altés, A.F. Remacha,
P. Sarda, F.J. Sancho,
A. Sureda, R. Martino,
J. Briones, S. Brunet,
C. Canals, J. Sierra*

Bone Marrow Transplan-
tation 2004;34:505-509.



“La sobrecarga hepática de hierro severa es frecuente tras el trasplante de progenitores hematopoyéticos y está posiblemente asociada con la aspergilosis invasiva.”

Resumen:

Introducción y Objetivos: En el manuscrito 1 se concluía que los pacientes con gran sobrecarga férrica morían antes, fundamentalmente por mortalidad tóxica de carácter infeccioso. En este trabajo se cuantificó los depósitos de hierro en las necropsias de un grupo de pacientes muertos tras un trasplante de pro-

genitores hematopoyéticos, para evaluar cuan frecuente era la sobrecarga férrica en este tipo de pacientes. Además se intentó hallar asociaciones entre causas de muerte tóxica y sobrecarga férrica en estos pacientes.

Pacientes y Métodos: Se estudió un grupo de 59 pacientes que murieron tras trasplante de progenitores hematopoyéticos y en los que se pudo realizar estudio necrópsico. Todos los pacientes recibieron acondicionamientos de intensidad convencional, y el tipo de trasplante fue autólogo en 24 y alogénico en 35. En 31 pacientes el implante procedía de la médula ósea, y en 28 de la sangre periférica. La edad mediana del grupo fue 41 años (rango, 19-66), 41 eran hombres y 18 mujeres. El diagnóstico en 26 pacientes era de leucemia aguda o síndrome mielodisplásico, en 10 leucemia mieloide crónica, en 17 linfoma, en 4 mieloma y en 2 anemia aplásica. Se revisaron todos los registros clínicos y anatomopatológicos por un patólogo independiente (FJS) con especial atención a las causas de mortalidad tóxica, fundamentalmente enfermedad veno-oclusiva del hígado, enfermedad de injerto contra huésped e infecciones severas. Los depósitos

de hierro en hígado se analizaron con metodología morfológica y bioquímica (estudio colorimétrico). Las asociaciones entre los niveles de hierro hepático y las variables clínicas categóricas se estudiaron mediante la prueba estadística de χ^2 . Las variables clínicas que presentaron asociación significativa con los niveles de hierro se valoraron como variables dependientes en un modelo multivariante de regresión logística, ajustado para las variables edad, sexo, diagnóstico, estadio, tipo de trasplante y enfermedad de injerto contra huésped. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos si presentaban una $P < 0.05$

Resultados: La concentración mediana de hierro en tejido hepático seco fue de 138 $\mu\text{mol/g}$ (rango 31-631 $\mu\text{mol/g}$). La concentración de hierro hepático fue $> 100 \mu\text{mol/g}$ en el 70% de los pacientes y $> 200 \mu\text{mol/g}$ en el 29%). El índice de hierro hepático fue > 1.9 en el 83% de los pacientes. No se halló relación alguna entre la sobrecarga férrica y la mortalidad por enfermedad veno-oclusiva hepática, enfermedad de injerto contra huésped, muerte por causa bacteriana o viral

ni tampoco con infección grave por *Candida*. Sin embargo, 4/32 (12%) de los pacientes con una concentración hepática de hierro inferior a 150 $\mu\text{mol/g}$ y 10/27 (37%) con una concentración de hierro hepático superior o igual a 150 $\mu\text{mol/g}$ presentaban aspergilosis invasiva en el estudio necrópsico ($P = 0.035$). Esta diferencia resultó estadísticamente significativa en el análisis multivariado (RR 9; IC 95% 1.6-50.3, $P = 0.012$). De entre los pacientes autotrasplantados, ninguno de los 14 pacientes con hierro hepático $< 150 \mu\text{mol/g}$ presentó Aspergilosis invasiva, mientras que 4/10 (40 %) de los pacientes con hierro hepático por encima de esta cifra sufrieron la infección ($P = 0.02$).

Conclusiones: La sobrecarga de hierro severa es muy frecuente en los pacientes que mueren tras un trasplante de progenitores hematopoyéticos (Índice de hierro hepático $> 1,9$ en 83% de los pacientes). Además, la mortalidad por aspergilosis invasiva es mayor entre los pacientes con sobrecarga de hierro severa. Esta última asociación es especialmente importante en pacientes autotrasplantados.

NOTA: MANUSCRITO ANEXO – PARTE NO FUNDAMENTAL

Este artículo no fue aceptado por la subcomisión de postgrado de la comisión de asuntos académicos por no constar la afiliación del doctorando a la UAB. No obstante, su presentación se admitió puesto que los datos que en él se detallan son básicos para un conocimiento evolutivo y racional de la sucesión de trabajos de esta tesis doctoral.

Frequent severe liver iron overload after stem cell transplantation and its possible association with invasive aspergillosis

A Altes¹, AF Remacha¹, P Sarda¹, FJ Sancho², A Sureda¹, R Martino¹, J Briones¹, S Brunet¹, C Canals¹ and J Sierra¹

¹Department of Hematology, Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain; and ²Department of Pathology, Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain

Summary:

Iron overload is associated with free radical generation and tissue damage. Our main objective was to ascertain the frequency and severity of iron overload in a group of 59 patients who died after conventional-intensity autologous ($n=24$) or allogeneic ($n=35$) haematopoietic stem cell transplantation (HSCT). A second objective was to investigate associations between liver-iron concentration and causes of transplant-related mortality. The median age was 41 years (range, 19–66), 41 were males and 18 females. In total, 26 patients had acute leukaemia or MDS, 10 CML, 17 lymphoma, four myeloma and two aplastic anaemia. The median hepatic iron concentration (HIC) was 138 $\mu\text{mol/g}$ dry weight (7.7 mg/g; range 31–631 $\mu\text{mol/g}$). In total, 4/32 (12%) patients with HIC <150 $\mu\text{mol/g}$ and 10/27 (37%) with hepatic iron $\geq 150 \mu\text{mol/g}$ showed invasive aspergillosis at autopsy ($P=0.035$). This was significant in multivariate analysis (RR 9.0; 95% CI 1.6–50.3, $P=0.012$). In conclusion, severe iron overload is frequent in patients who die following HSCT and is associated with invasive aspergillosis.

Bone Marrow Transplantation (2004) 34, 505–509.
doi:10.1038/sj.bmt.1704628

Published online 2 August 2004

Keywords: iron overload; aspergillosis; TRM; HSCT

The consequences of iron overload during haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) have been studied in diseases classically associated with siderosis, such as thalassaemia.^{1,2} Iron overload is not usually taken into account when the indication for HSCT is a malignancy. Nevertheless, secondary iron overload may be frequent in this setting as these patients have often been heavily transfused prior to HSCT. Free iron acts as a free radical catalyst, and may increase mucositis, vasculitis, and other

toxic effects of the conditioning regimen.^{3,4} These adverse events and the high availability of free iron might increase microbial growth and the probability of severe infections.⁵ Indeed, iron is an essential element for all pathological microorganisms. It is therefore possible that iron overload may significantly increase transplant-related mortality (TRM) due to toxic death and lethal infections in immunocompromised patients.

The main objective of this work was to describe the distribution of liver iron concentration in 59 liver samples from consecutive post-mortem studies in patients who died after conventional-intensity HSCT. We also investigated possible associations between hepatic iron concentration (HIC) and causes of TRM confirmed in a revision of pathology findings at post mortem.

Materials and methods

We retrospectively studied all post-mortem examinations performed at the Sant Pau Hospital Pathology Department from July 1990 to December 2001 in patients who had undergone conventional-intensity HSCT. Clinical and necropsy records were analysed, and all microscopic pathological samples were reviewed by an independent pathologist (FJS). Special attention was paid to causes of TRM such as veno-occlusive disease of the liver (VOD), acute graft-versus-host disease (GVHD), and severe infections. In all cases, stainable liver iron was assessed from paraffinated liver samples using Tirmann Schmelzer's technique,⁶ and biochemical iron quantification was performed with colorimetric analysis.⁷ Our 95% CI for iron liver concentration in necropsy with this method is $13 \pm 8 \mu\text{mol/g}$ dry weight (dw).⁸

We defined patients as in the early clinical stage when they were in first complete or partial remission, in contrast with more advanced stages. The criteria established by the EORTC-MSG were used to define invasive fungal infections.⁹ Since all findings were by histology, a definite diagnosis was made in each case. The presence of tissue-invasive branched septated hyphae or yeasts with or without pseudohyphae in lung and/or other organs plus a positive pre- or post-mortem culture was defined as definite invasive aspergillosis and candidiasis, respectively. CMV disease was defined by the presence of CMV-like

Correspondence: Dr A Altes, Servei de laboratory, Hospital de l'Esperit Sant, Avda Mossèn Pons i Rabada s/n, 08923 Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain; E-mail: aaltes@hes.scs.es
Received 7 December 2003; accepted 7 May 2004
Published online 2 August 2004

inclusions by histology plus a positive culture and/or immunohistochemistry.¹⁰ Acute and chronic GVHD were staged by established criteria^{11,12} and histological evidence at autopsy. Other infections were defined by standard histological and microbiological findings at autopsy. All potentially lethal relevant findings at autopsy were considered as contributory to death (GVHD, invasive aspergillosis, VOD, etc).

Statistical methods

Descriptive statistic parameters were used to determine liver iron concentration in this series of patients. A linear regression was calculated between liver iron concentrations measured by pathological and biochemical methods. Associations between different liver iron levels and categorical variables (causes of TRM) were studied by the χ^2 test. If an association between liver iron concentration and a cause of TRM was detected, a logistic forward stepwise regression model was used to ascertain whether the liver iron concentration had an independent statistical value to predict the cause of TRM. The results were considered statistically significant at $P < 0.05$.

Results

Liver samples obtained at post-mortem study in 59 patients previously submitted to HSCT were revised. Clinical data were obtained in all cases from our transplant database. Baseline data in this series prior to transplant are shown in Table 1.

Toxicity

Six patients did not engraft, and one patient experienced secondary graft failure. VOD was diagnosed clinically in four patients. In total, 17 developed grade III-IV acute GVHD in the first 100 days post-transplant, and six patients developed extensive chronic GVHD after this time. In total, 34 patients had evidence of infection at necropsy: 11 bacterial, 21 viral (17 CMV), and 20 fungal (six *Candida* and 14 *Aspergillus*). In total, 23 patients relapsed before death. The overall median post-transplant survival in this series was 5 months (95% CI 3-6).

Liver iron concentrations

The correlation between pathological and biochemical methods to measure liver iron was good ($R^2 = 0.8$, $P < 0.001$). The median liver iron concentration in these patients was $138 \mu\text{mol/g}$ (7.7 mg/g) dw (range 31-621 $\mu\text{mol/g}$ dw). The concentration was $> 100 \mu\text{mol/g}$ (5.6 mg/g) dw in 41 (70%), and $> 200 \mu\text{mol/g}$ (11.2 mg/g) dw in 17 (29%). The hepatic iron index was over 1.9 in 49 patients (83%). Differences in iron load between patients after allo or autotransplant were not significant, median liver iron concentration $146 \mu\text{mol/g}$ (8.2 mg/g) dw and $133 \mu\text{mol/g}$ (7.4 mg/g) dw, respectively ($P = 0.9$).

Table 1 Baseline characteristics of the 59 patients prior to transplant

Age	
Median (range)	41 (19-66)
Gender	
Male/female	41/18
Diagnosis	
Acute leukaemia	23
Myelodysplastic syndromes	3
Chronic myeloid leukaemia	10
Lymphoma	17
Multiple myeloma	4
Aplasia	2
Stage	
Early	31 (52%)
Advanced	28 (48%)
Type of transplant	
Autologous	24 (41%)
Allogeneic	35 (59%)
Source of stem cells	
Bone marrow	31 (52%)
Peripheral blood	28 (48%)
Conditioning	
With TBI	36 (64%)
Without TBI	23 (36%)
GVHD prevention (allo only)	
Cyclosporine and methotrexate	24 (69%)
Cyclosporine and prednisone	4 (11%)
Cyclosporine only	7 (20%)

Relation with causes of TRM

Possible associations between transplant events and a high liver iron concentration (defined as $\geq 150 \mu\text{mol/g}$ or 8.4 mg/g dw) were investigated. Univariate analyses showed no relationship between liver iron and VOD, GVHD (acute and chronic) and death related with bacterial or viral infections. TRM at 6 months and median survival of patients with liver iron concentrations above and under $150 \mu\text{mol/g}$ dw was also similar. No relationship was found between *Candida* infection and liver iron content. Nevertheless, a statistically significant relationship was found between invasive *Aspergillus* infection and a high liver iron concentration (Table 2). Other variables related with *Aspergillus* infection were the presence of acute GVHD grade III-IV ($P = 0.046$) and concomitant CMV infection ($P = 0.015$). No relationship was found between *Aspergillus* infection and graft failure or the duration of disease. We also analysed the relationship between severe iron overload and *Aspergillus* infection in each transplant category. In the allotransplanted group, 6/17 patients (35%) with severe iron overload had *Aspergillus* infection at necropsy, as compared to 4/18 patients with a lower iron level (22%, $P = \text{NS}$). In the autotransplant group, 4/10 patients (40%) with a high iron concentration developed *Aspergillus* infection, while none of the 14 patients with a lower iron level presented this infection (0%, $P = 0.02$). Some clinical

Table 2 Relationships between HIC and causes of TRM

	HIC < 150 µmol/g dw	HIC ≥ 150 µmol/g dw	P
VOD	4/32 (12%)	0/27 (0%)	0.1
aGVHD III IV	10/18 (55%)	9/17 (53%)	1
Ext cGVHD	3/8 (37%)	3/7 (43%)	1
Bacterial infection	8/32 (25%)	3/27 (11%)	0.2
Viral infection	13/32 (41%)	8/27 (30%)	0.4
CMV infection	11/32 (34%)	6/27 (22%)	0.4
Candida infection	3/32 (9%)	3/27 (11%)	1
<i>Aspergillus</i> infection	4/32 (12%)	10/27 (37%)	0.035
TRM 6 months	15/32 (47%)	14/27 (52%)	0.8

Bold represents statistically significant.

Table 3 Clinical characteristics of patients with invasive aspergillosis at death and high HIC (≥ 150 µmol/g dw)

	Gender	Age	Disease	Transplant	Stage	aGVHD	cGVHD	CMV	Engraftment	Graft failure
1	Male	61	NHL	Allo	Early	III	No	Yes	Yes	No
2	Male	36	AML	Allo	Advanced	IV	No	Yes	Yes	No
3	Male	22	Aplastic anaemia	Allo	Early	III	Extensive	Yes	Yes	No
4	Male	24	ALL	Auto	Early			No	Yes	No
5	Male	45	HD	Auto	Advanced			No	Yes	Yes
6	Male	45	AML	Allo	Early	II	No	No	Yes	No
7	Male	20	ALL	Auto	Advanced			No	Yes	No
8	Male	66	AML	Auto	Early			No	Yes	No
9	Female	38	CML	Allo	Early	IV	No	No	Yes	No
10	Male	49	AML	Allo	Early	III	Extensive	Yes	Yes	No

characteristics of patients with high iron levels and invasive aspergillosis at death are shown in Table 3. Most of them had other relevant risk factors for aspergillosis such as acute GVHD or graft failure. Nevertheless, in the multivariate analysis adjusted for age, gender, diagnosis, stage, type of transplant, presence of graft failure and acute GVHD (grades III IV vs others), only two variables remained significant to predict the appearance of *Aspergillus* infection; a liver iron concentration ≥ 150 µmol/g dw and a concomitant CMV infection (Table 4).

Discussion

Iron overload at conditioning has been associated with an increase in toxic deaths after transplant.¹³ Strasser *et al.*⁴ examined the hepatic iron overload in 10 consecutive patients who died between 50 and 100 days after transplant. The median liver iron concentration was 77 µmol/g dw (range 33–235) with a median HII of 3.85 (range 0.76–8.14). Iron overload is also common in paediatric bone marrow transplantation.¹⁵ Our findings confirm these data, with a median HIC in our series of 138 µmol/g dw (range 31–631) and a median HII of 3.7 (range 0.6–15.3), with HII > 1.9 (criteria of genetic hemochromatosis) in 83% of patients. Our 95% CI for iron liver in necropsy was slightly higher than that reported using other methods, but the very high iron levels detected cannot be explained by a methodological bias. The concordance between pathological and biochemical methods to measure liver iron was also high. Causes of iron overload in HSCT patients are probably diverse, although transfusions are likely to be the main cause.

Table 4 Multiple logistic regression analysis for independent and significantly related variables with the presence of *Aspergillus* spp infection in post-mortem studies

	Slope(B)	P	Exp(B)	95% CI Exp(B)
CMV infection	2.4	0.005	11.3	2.1–61.7
HIC > 150 µmol/g dw	2.2	0.012	9	1.6–50.3

Other variables included in the model were age, gender, diagnosis, stage (early or advanced), type of transplant, and presence of graft failure or aGVHD (grades III IV vs others). *N* = 59.

While one may expect VOD to be related to iron overload since iron is fundamentally stored in liver,¹⁶ the four patients with VOD had near normal iron stores. These data are too limited to allow any conclusions to be drawn on the role of iron in the pathogenesis of VOD.

Although iron is constantly present in human body fluids, the amount of free iron, which might be readily available to bacteria and fungi, is low under physiological conditions (about 10⁻¹⁸ M). Transferrin saturation increases during chemoradiotherapy, often reaching indexes of over 80% with the presence of nontransferrin-bound iron.^{17,18} The coexistence of a high plasma iron availability with damage to the mucosal barrier could predispose to infectious events. Bacteria, fungi and protozoa have very active iron-uptake systems and can therefore multiply successfully *in vivo* in order to establish an infection.¹⁹ A clinical example of this is the increased rate of zygomycosis among dialysis patients treated with desferrioxamine because iron bound to desferrioxamine is efficiently used as an iron source by some species of *zygomycetes*.²⁰ We saw an association between *Aspergillus* and iron overload, more clearly with autografts than with allografts. In allograft patients, other potentially more important variables such as acute GVHD, immunosuppression, CMV, and steroid treatment may mask any effect of iron.

How do we explain the iron overload relationship found with *Aspergillus* spp but not with other pathogens? Two experimental observations *in vitro* can help us to explain this interesting phenomenon. First, *Aspergillus fumigatus* is the only fungal pathogen able to thrive and grow in the presence of up to 80% human serum and up to 80% FBS. In addition, the levels of proteinase secretion in *A. fumigatus* (an important factor of pathogenicity,

invasiveness and lethality) are very high when either human serum or FBS are present. It seems *A. fumigatus* is able to use iron in serum and that a combination of available iron and protein in serum permits abundant growth of the pathogen.²¹ Second, the mechanism by which *A. fumigatus* obtains iron in serum-containing media has recently been revealed. Five siderophores were purified from *A. fumigatus* culture medium, and the two major siderophores were identified as triacetylfusarinine C and ferrirocen. Both molecules can remove iron from holotransferrin with an affinity comparable to that of ferrichrome. *A. fumigatus* survival in human serum involves siderophore-mediated removal of iron from transferrin. Proteolytic degradation of transferrin by proteinases may play a secondary role in iron acquisition.²² Indeed, the deletion of *A. nidulans* gene *sidA* completely blocks triacetylfusarinine C and ferrirocen biosynthesis, and siderophore-deficient strains are unable to grow.²³ Two experimental findings *in vivo* can be related with the iron-dependency of *Aspergillus*: the preventive effect of endotoxin against *Aspergillus* infection in mice,²⁴ and the delayed lethal response to *A. fumigatus* infection in sarcoma 180 tumour-bearing mice. These results may be mediated by a significant decrease in serum iron levels and an increase in unbound iron binding capacity in these mice as compared to nonmanipulated mice.²⁵ Iron is so essential for the growth of fungal hyphae that intracranial aspergilomas can be identified by MRI with a low signal on T2-weighted images, corresponding to iron accumulation.²⁶ Interestingly, previous clinical papers have related iron overload and infection in immuno-deficient patients, and the infection was always produced by *Aspergillus* or *Mucor*.²⁷⁻²⁹ In our series, *Aspergillus* infection was not related with neutropenia or acute GVHD, probably because 41% of cases were autologous transplants and the number of patients with long-standing neutropenia or severe acute GVHD was low. An association between CMV disease and fungal infections has been noted not only in solid organ transplant recipients^{30,31} but also in recipients of HSCT.³²⁻³⁴ The relationship between both pathogens remains obscure.

This work shows that severe iron overload is frequent in patients who die after HSCT, and for the first time, it reveals a relationship between severe iron overload and invasive aspergillosis. Nevertheless, the number of patients examined is low, and the results should be confirmed in studies in larger series. The cumulative incidence rate of invasive aspergillosis (about 14%) after myeloablative and nonmyeloablative conditioning has increased in recent years³⁴ and is one of the main causes of death in transplanted patients. If these results are reproduced with prospective data, pre-transplant manoeuvres to decrease iron overload³⁵ or transferrin saturation with human transferrin infusions during conditioning³⁶ would be proposed to lower TRM and improve survival.

References

- Lucarelli G, Galimberti M, Polchi P et al. Bone marrow transplantation in patients with thalassemia. *N Engl J Med* 1990; **322**: 417-421.
- Angelucci E, Muretto P, Nicolucci A et al. Effects of iron overload and hepatitis C virus positivity in determining progression of liver fibrosis in thalassemia following bone marrow transplantation. *Blood* 2002; **100**: 17-21.
- Halliwil B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; **119**: 598-620.
- Carmine TC, Evans P, Bruchel G et al. Presence of iron catalytic for free radical reactions in patients undergoing chemotherapy: implications for therapeutic management. *Cancer Lett* 1995; **94**: 219-226.
- Bullen JJ. The significance of iron in infection. *Res Infect Dis* 1981; **3**: 1127-1138.
- Brissot P, Bouzel M, Herry D et al. Assessment of liver iron content in 271 patients: a reevaluation of direct and indirect methods. *Gastroenterology* 1981; **80**: 557-565.
- Barry M, Sherlock S. Measurement of liver-iron concentration in needle-biopsy specimens. *Lancet* 1971; **1**: 100-103.
- Gimferrer E, Sancho FX. Las hepatosiderosis. I. Planteamientos patogénicos y diagnósticos. *Bio-Ferrun* 1997; **2**: 53-60.
- Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002; **34**: 7-14.
- Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; **34**: 1094-1097.
- Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P et al. 1994 consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; **15**: 825-828.
- Sullivan KM, Agura E, Anasetti C et al. Chronic graft-versus-host disease and other late complications of bone marrow transplantation. *Semin Hematol* 1991; **28**: 250-259.
- Allès A, Remacha AF, Sureda A et al. Iron overload might increase transplant-related mortality in haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; **29**: 987-989.
- Strasser SI, Kowdley KV, Sale GE, McDonald GB. Iron overload in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1998; **22**: 167-173.
- Korreich L, Horev G, Yaniv I et al. Iron overload following bone marrow transplantation in children: MR findings. *Pediatr Radiol* 1997; **27**: 869-872.
- Bothwell TH, MacPhail AP. Hereditary hemochromatosis: etiologic, pathologic and clinical aspects. *Semin Hematol* 1998; **35**: 55-71.
- Bradley SJ, Goswiltana I, Srichairatanakool S et al. Non-transferrin-bound iron induced by myeloablative chemotherapy. *Br J Haematol* 1997; **99**: 337-343.
- Sahlstedt L, Ebeling F, Bonsdorff L et al. Non-transferrin-bound iron during allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2001; **113**: 836-838.
- Griffiths E, Williams P. The iron-uptake systems of pathogenic bacteria, fungi and protozoa. In: Bullen JJ, Griffiths E (eds.). *Iron and Infection*. John Wiley & Sons: Chichester, 1999; pp 87-212.
- Boelaert JR, de Locht M, Van Cutsem J et al. Mucormycosis during deferoxamine therapy is a siderophore-mediated infection. *In vitro* and *in vivo* animal studies. *J Clin Invest* 1993; **91**: 1979-1986.
- Gifford AHT, Klippenstein JR, Moore MM. Serum stimulates growth of and proteinase secretion by *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 2002; **70**: 19-26.
- Hissen AH, Chow JM, Pinto LJ, Moore MM. Survival of *Aspergillus fumigatus* in serum involves removal of iron from transferrin: the role of siderophores. *Infect Immun* 2004; **72**: 1402-1408.

- 23 Eisendle M, Oberegger H, Zadra I, Haas H. The siderophore system is essential for viability of *Aspergillus nidulans*: functional analysis of two genes encoding l-ornithine N 5-monooxygenase (sidA) and a non-ribosomal peptide synthetase (sidC). *Mol Microbiol* 2003; **49**: 359–375.
- 24 Abe F, Katoh T, Kaneko T, Hotchi M. Effects of endotoxin (lipopolysaccharides) on experimental aspergillosis in leukemic mice. *Mycopathologia* 1987; **99**: 95–97.
- 25 Okawa Y, Murata Y, Suzuki M *et al.* Delayed lethal response to *Aspergillus fumigatus* infection in sarcoma 180 tumor-bearing mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; **34**: 113–117.
- 26 Yamada K, Zoarski GH, Rothman MI *et al.* An intracranial aspergilloma with low signal on T2-weighted images corresponding to iron accumulation. *Neuroradiology* 2001; **43**: 559–561.
- 27 Iglesias-Osma C, Gonzalez-Villarón L, San Miguel JF *et al.* Iron metabolism and fungal infections in patients with haematological malignancies. *J Clin Pathol* 1995; **48**: 223–225.
- 28 Maertens J, Demuyck H, Verbeke EK *et al.* Mucormycosis in allogeneic bone marrow transplant recipients: report of five cases and review of the role of iron overload in the pathogenesis. *Bone Marrow Transplant* 1999; **24**: 307–312.
- 29 Brandhagen DJ, Alvarez W, Therneau TM *et al.* Iron overload in cirrhosis-HFE genotypes and outcome after liver transplantation. *Hepatology* 2000; **31**: 456–460.
- 30 Husni RN, Gordon SM, Longworth DL *et al.* Cytomegalovirus infection is a risk factor for invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Clin Infect Dis* 1998; **26**: 753–755.
- 31 George MJ, Snyderman DR, Werner BG *et al.* The independent role of cytomegalovirus as a risk factor for invasive fungal disease in orthotopic liver transplant recipients. Boston center for liver transplantation CMVIG study group. *Am J Med* 1997; **103**: 106–113.
- 32 Marr KA, Carter RA, Boeckh M *et al.* Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood* 2002; **100**: 4358–4366.
- 33 Grow WB, Moreb JS, Roque D *et al.* Late onset of invasive *Aspergillus* infection in bone marrow transplant patients at a university hospital. *Bone Marrow Transplant* 2002; **29**: 15–19.
- 34 Fukuda T, Boeckh M, Carter RA *et al.* Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants after nonmyeloablative conditioning. *Blood* 2003; **102**: 827–833.
- 35 de la Serna J, Bornstein R, Garcia-Bueno MJ, Lahuerta-Palacios JJ. Iron depletion by phlebotomy with recombinant erythropoietin prior to allogeneic transplantation to prevent liver toxicity. *Bone Marrow Transplant* 1999; **23**: 95–97.
- 36 Sahlstedt L, von Bonsdorff L, Ebeling F *et al.* Effective binding of free iron by a single intravenous dose of human apotransferrin in haematological stem cell transplant patients. *Br J Haematol* 2002; **119**: 547–553.

3.1.3. EARLY CLINICAL IMPACT OF IRON OVERLOAD IN STEM CELL TRANSPLANTATION. A PROSPECTIVE STUDY

*A. Altés, A.F. Remacha,
P. Sarda, M. Baiget,
A. Sureda, R. Martino,
J. Briones, S. Brunet,
C. Canals, J. Sierra*

Annals of Hematology
2007;86:443-447



“Impacto clínico precoz de la sobrecarga férrica en el trasplante de progenitores hematopoyéticos. Un estudio prospectivo”

Resumen:

Introducción y Objetivos: En el manuscrito 1 concluimos que los pacientes con gran sobrecarga férrica parecen sobrevivir menos tras un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) y mueren más por causas tóxico -infecciosas. En el manuscrito 2 evidenciamos que la sobrecarga férrica grave es muy frecuente en los pacientes que mueren tras un TPH, y que la infección por aspergillus era

particularmente frecuente en pacientes con gran sobrecarga férrica, pero no así la presencia de otras infecciones. El objetivo de este estudio fue evaluar la frecuencia de la sobrecarga férrica bioquímica en un grupo mas amplio de pacientes, así como evaluar la asociación existente entre dicha sobrecarga férrica y eventos de carácter tóxico –infeccioso precoces (tres primeros meses) más sutiles y no detectables mediante estudios de mortalidad o necropsia.

También se quiso evaluar si las mutaciones del gen HFE (causales de hemocromatosis hereditaria tipo I) influían en el patrón férrico de los pacientes.

Pacientes y Métodos: Se evaluaron 81 pacientes que recibieron un trasplante de progenitores hematopoyéticos, de forma prospectiva durante los primeros tres meses post-trasplante en cuanto a la presencia de mucositis grave (grado III-IV), bacteriemias documentadas y días de fiebre. Todos los pacientes se hallaban en remisión completa como mínimo tres meses antes del trasplante. 43 eran hombres y 38 mujeres, con una edad mediana de 54 años. Veintinueve pacientes

sufrían leucemia aguda, 28 mieloma múltiple y 24 linfoma. El trasplante fue autólogo en 50 casos, alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida en 23 y alogénico convencional en 8. Se determinaron en todos los pacientes la saturación de transferrina y niveles de ferritina sérica pre-trasplante, y se contabilizó el número de días después del día 0 en que los pacientes presentaron un nivel de saturación de transferrina superior al 80% (para ello se midieron dichos niveles de saturación dos veces por semana desde el día 0 a la recuperación de neutrófilos $\geq 500/\mu\text{l}$). Se realizó estudio en todos los pacientes de las mutaciones del gen HFE mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa y estudio de la curva de melting con el sistema Lyght Cycler. Las diferencias entre variables categóricas se midieron mediante la prueba de χ^2 , y las diferencias entre medias mediante la prueba T de Student. El modelo multivariado usado para predecir la aparición de mucositis grave y bacteriemia fue la regresión logística, mientras que el usado para predecir los días de fiebre fue un modelo de regresión múltiple, en ambos casos ajustados por las variables

sexo, edad, enfermedad de base, estado de la enfermedad, tipo de trasplante, uso de ICT, número de células CD 34+ infundidas y número de días hasta la recuperación de los neutrófilos $\geq 500/\mu\text{l}$.

Resultados: Los eventos clínicos no mostraron asociación ni con los niveles de saturación de transferrina pre-trasplante ni con el número de días en que los pacientes presentaban una saturación de transferrina $\geq 80\%$. Sin embargo, un nivel de ferritina sérica pre-trasplante superior a $1.500 \mu\text{g/l}$ predijo la aparición de mucositis severa, bacteriemia y los días de fiebre tanto en los estudios estadísticos univariados ($P= 0.03$, $P= 0.03$ y $P= 0.03$) como en los análisis multivariados ($P= 0.03$, $P= 0.006$ y $P= 0.002$). Además, el porcentaje de pacientes con bacteriemia positiva parecía aumentar según el nivel de ferritina sérica (ver tabla 4 del artículo original). Sin embargo, estudios estadísticos posteriores revelaron que el valor predictivo de los niveles de ferritina sérica pre-trasplante se restringían a los pacientes AUTO-trasplantados tanto en los estudios univariados ($P=0.05$, $P=0.05$ y $P<0.001$) como en los multivariados ($P= 0.03$, $P= 0.05$ y

P<0.001), en contraste con los pacientes ALO-trasplantados donde esta variable no alcanzó significación estadística. El bajo número de pacientes homocigotos C282Y (0) o heterocigotos dobles C282Y/H63D (2) impidió estudiar si las alteraciones del gen HFE influían en el patrón férrico.

Conclusiones: Un nivel elevado de ferritina pre-trasplante $\geq 1.500 \mu\text{g/l}$ está asociado a la presentación de complicaciones tóxicas (mucositis grave) e infecciosas (bacteriemias, días febriles) durante la fase precoz del TPH antólogo (primeros tres meses).

Early clinical impact of iron overload in stem cell transplantation. A prospective study

Albert Altes · Angel Francisco Remacha · Pilar Sarda ·
Montserrat Baiget · Anna Sureda · Rodrigo Martino ·
Javier Briones · Salut Brunet · Carme Canals ·
Jorge Sierra

Received: 20 November 2006 / Accepted: 18 January 2007 / Published online: 6 February 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract Toxic-infectious complications may be related with iron toxicity after a stem cell transplant (SCT). Eighty one patients who underwent SCT were prospectively evaluated over 3 months for mucositis, bacteraemia and febrile days. Pre-SCT transferrin saturation (TS), ferritin level and the number of days with $TS \geq 80\%$ after transplant were determined. A ferritin level $>1,500 \mu\text{g/l}$ predicted the appearance of severe mucositis, bacteraemia and days with fever in univariate ($P=0.03$, $P=0.03$ and $P=0.03$) and multivariate analysis ($P=0.03$, $P=0.006$ and $P=0.002$). Nevertheless, further statistical studies revealed that the predictive value of pre-SCT ferritin levels was restricted to AUTO-transplanted patients in both univariate ($P=0.05$, $P=0.05$ and $P<0.001$) and multivariate ($P=0.03$, $P=0.05$ and $P<0.001$) analysis, in contrast with the ALLO-transplanted group where this variable did not reach statistical significance. In conclusion, iron burden seems to influence the appearance of toxic-infectious complications during the first 3 months after transplant in AUTO-transplanted patients.

A. Altes · A. F. Remacha · P. Sarda · A. Sureda · R. Martino ·
J. Briones · S. Brunet · C. Canals · J. Sierra
Department of Haematology,
Hospital de Sant Pau,
Autonomous University of Barcelona,
Barcelona, Spain

M. Baiget
Department of Genetics Service, Hospital de Sant Pau,
Autonomous University of Barcelona,
Barcelona, Spain

A. Altes (✉)
Servei de laboratori, Hospital de l'Esperit Sant,
Avda Mossen Pons i Rabada s/n,
08923 Santa Coloma de Gramenet,
Barcelona, Spain
e-mail: aaltes@hes.es.es

Keywords Iron overload · Stem cell transplantation ·
Mucositis · Bacteraemia · Febrile days

Introduction

Chemoradiotherapy conditioning for stem cell transplantation (SCT) causes toxicity and immunosuppression leading to organ damage and infectious diseases, fundamentally within first 3 months of the procedure. Iron overload (IO) is a frequent condition in SCT [2, 17], and it can increase toxic and infectious events. Free iron acts as a free radical catalyser and may aggravate mucositis, vasculitis and other toxic effects of the conditioning regimen [7, 11]. Moreover, the high availability of free iron might increase microbial growth and the probability of severe infections. Indeed, iron is an essential element for all pathological microorganisms [6].

An association between IO and infectious SCT complications was detected in previous studies [1, 2, 15]. In the present work, we prospectively evaluated the impact of biochemical IO on the appearance of toxic and infectious events (severe mucositis, bacteraemia and days with fever) in the first 3 months after SCT.

Materials and methods

Patients who underwent a peripheral blood SCT as consolidation therapy were prospectively enrolled in the study over a period of 1.5 years. Allogeneic non-related transplants were excluded. All patients were in complete remission (CR) or presented an objective response (OR) in case of myelomas. ECOG was always ≤ 2 . Finally, 81 patients who fitted the inclusion and exclusion criteria were selected. All patients gave written informed consent, and

the study was approved by the Institutional Ethics Committee. The patients' characteristics are summarised in Table 1.

Conditioning regimens The conditioning regimens used were: cyclophosphamide total body irradiation in 19 cases, high dose cyclophosphamide, carmustine and etoposide (CBV) in 10 cases, high-dose carmustine, etoposide, citarabine and melphalan (BEAM) in 10 cases, high-dose melphalan in 19 cases and a fludarabine-based reduced intensity conditioning (RIC) [14] in 23 cases. Peripheral blood stem cells were infused on day 0.

Blood parameters related with iron metabolism (independent study variables) Transferrin saturation (TS) and ferritin were serially measured in each patient. A first sample was extracted pre-SCT, and the others were taken twice weekly from day 0 until neutrophil recovery [absolute neutrophil count (ANC) \geq 500/ μ l]. In all patients, the number of days with TS $>$ 80% from day 0 were calculated and recorded for analysis. The HFE genotype was determined in all cases by a previously published method [3].

Variables related with infection or toxicity (dependent variables of study) We recorded three post-SCT clinical variables related with infection or toxicity in the first 90 days after transplant:

Mucositis: This was assessed by specifically trained research nurses. Mucositis data, including stomatitis, dysphagia-esophagitis and colitis, were reviewed and

graded 0 to 4 as defined in the Common Toxicity Criteria from the National Cancer Institute CTC Version 2.0, April 30, 1999 (http://ctep.cancer.gov/forms/CTCv20_4-30-992.pdf).

Presentation of bacteraemia. Patients with positive blood cultures for skin contaminant pathogens were included if at least two blood cultures yielded the same organism with the same antibiogram.

Cumulative number of febrile days during transplant (axillary temperature $>$ 38°C).

Additional clinical variables Eight clinical variables were recorded to be included as modifier factors in multivariate analysis: sex, age, baseline disease, status of disease (1st CR OR vs \geq 2nd CR OR), SCT type (autologous, conventional-allogeneic and RIC allogeneic SCT), total body irradiation (TBI) use, number of CD 34+ \times 10⁶/Kg cells infused and number of days until neutrophil recovery (ANC \geq 500/ μ l).

Statistical methods

Differences between categorical variables were measured by the chi-square test, and differences between means in the continuous variables were calculated with the Student's *t* test. Logistic regression was used to evaluate variables related to the appearance of grade III–IV mucositis and positive bacteraemia and a multiple regression in the case of the number of febrile days. Results were assessed as statistically significant when *P* values were less than 0.05.

Table 1 Clinical characteristics of patients

Clinical characteristics	
Sex	
Men	43 (53%)
Women	38 (47%)
Median age	54 years (range 19–70)
Disease	
Leukaemia and transformed MDS	29 (36%)
Multiple myeloma	28 (35%)
Lymphoma	24 (29%)
Disease status	
1st CR–OR	33 (40%)
>2nd CR–OR	48 (60%)
SCT type	
Autologous	50 (62%)
Allo conventional	8 (10%)
Allo RIC–SCT	23 (28%)
TBI use	
Yes	19 (23%)
Not	62 (77%)
CD 34+ \times 10 ⁶ /Kg cells infused	5.81; CI 95% 4.1–7.5
Median days to achieve ANC $>$ 500/ μ l	14 (range 9–25)

Results

Iron parameters in the 81 patients are summarised in Tables 2 and 3. The 75 percentile of independent variables (TS, serum ferritin and days with TS $>$ 80%) was selected as threshold value to study the statistical relationships between these variables and toxic-infectious events (see Table 3).

In the case of pre-SCT TS, 32% of patients with TS \geq 45% and 21% below suffered grade III–IV mucositis (*P*=

Table 2 Blood parameters related with iron metabolism

HFE Genotype	
C282Y	
Wild type	76 (94%)
Heterozygous	5 (6%)
Homozygous	0 (0%)
H63D	
Wild type	41 (51%)
Heterozygous	36 (44%)
Homozygous	4 (5%)

Table 3 Blood parameters related with iron metabolism with 75 percentile of independent variables selected as threshold value

Serum iron parameters			
	Mean	CI 95%	75 percentile threshold
Serum iron	17.05 $\mu\text{M/l}$	15.3–18.8	Non-defined
TIBC	47.8 $\mu\text{M/l}$	45.9–49.6	Non-defined
TS	37.3%	32.4–42%	>45%
Ferritin	954 $\mu\text{g/l}$	746–1163	>1,500 $\mu\text{g/l}$
Days with TS>80%	8.6 days	7.8–9.5	>11 days

0.25). Bacteraemia was present in five patients (26%) above this level and in 14 (23%) below ($P=0.5$). The mean number of days with fever was very similar in both groups (4.2 vs 4.1, $P=0.9$).

Four of 23 patients that maintained a TS \geq 80% for \geq 11 days from day 0 experienced grade III IV mucositis (17%), as compared to 15/58 (26%) below this level ($P=0.3$). Percentages of patients with bacteraemia were similar in both groups (17 and 26% respectively, $P=0.3$), and both groups had a similar mean number of days with fever (3.5 in front of 4.4, $P=0.9$).

Interestingly, patients with a ferritin level \geq 1,500 $\mu\text{g/l}$ more frequently presented grade III IV mucositis and episodes of bacteraemia, and they had more febrile days after transplant. Indeed, 8/19 patients above this threshold (42%) had severe mucositis and bacteraemia, as compared to 11/62 (18%) patients below ($P=0.03$). Microbiological results for all bacteraemic episodes are detailed in Table 4. The mean number of days with fever in patients above this ferritin threshold was 5.7, while it was 3.6 in the group below this level ($P=0.03$, CI 95% of difference 0.18 3.9). When we compared the results from patients with ferritin levels below the 50 percentile (0 849) with those from the third quartile (849 1,499 $\mu\text{g/l}$) and from the fourth (\geq 1,500 $\mu\text{g/l}$), we find that 7/43 patients (16%) had mucositis and bacteraemia in the

Table 4 Microbiological results of the 19 bacteraemic episodes in accordance with ferritin level

Ferritin level	<849 $\mu\text{g/l}$	Ferritin 849–1499	Ferritin >1500 $\mu\text{g/l}$
Number of patients	43	19	19
Bacteraemic episodes	7 (16.3%)	4 (21%)	8* (42.1%)
<i>S. epidermidis</i>	4	2	3
<i>P. aeruginosa</i>	1	2	2
<i>E. coli</i>	1	0	0
<i>S. viridans</i>	1	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	0	0	3
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	1
<i>Fusobacterium</i>	0	0	1

*In two bacteraemic episodes two micro-organisms were found

first group, 4/19 (21%) in the second and 8/19 (42%) in the third (lineal association test $P=0.03$). Curiously, the three groups presented the same percentages of mucositis and bacteraemia but in different individuals in each group. The mean number of days with fever in both the first and second groups was 3.6, while it was 5.7 in the third group ($P>0.05$).

The results were similar in the multivariate analysis. After introducing the study variables and the additional clinical variables specified in Materials and methods into a logistic regression model, only ferritin \geq 1,500 $\mu\text{g/l}$ maintained its value as an independent predictor of appearance of grade III IV mucositis (RR 3.4, CI 95% 1.1 10, $P=0.03$). In the case of bacteraemia, ferritin \geq 1,500 $\mu\text{g/l}$ (RR 6.1, CI 95% 1.7 22.3, $P=0.006$) and use of TBI (RR 0.09, $P=0.045$) were independent predictors. Finally, three variables were related with the number of days with fever: ferritin \geq 1,500 $\mu\text{g/l}$ ($B=3$; CI 95% 1.2 to 4.9; $P=0.002$), autologous vs allo-transplants ($B=-3.1$; CI 95% -3 to -4.8, $P=0.001$), and number of days with ANC<500/ μl ($B=0.3$; CI 95% 0.02 to 0.6, $P=0.04$).

Pre-SCT ferritin levels were significantly different between AUTO- (mean ferritin 769 $\mu\text{g/l}$) and ALLO- (mean ferritin 1,254 $\mu\text{g/l}$) transplants ($P=0.03$). For this reason, we tried to analyse the impact of pre-SCT ferritin levels in early infection independently, according to the transplant type (AUTO vs ALLO). In the group of AUTO-transplants, ferritin \geq 1,500 $\mu\text{g/l}$ was a univariate predictor for mucositis (50 vs 17%, $P=0.05$), bacteraemia (50% vs 17%, $P=0.05$) and number of febrile days (9 vs 4, $P<0.001$). Ferritin \geq 1,500 $\mu\text{g/l}$ retained its predictive value in multivariate analysis in this group of patients for severe mucositis (RR 2.3, $P=0.028$, CI 95% 1.3 to 79), bacteraemia (RR 1.6, $P=0.05$, CI 95% 1.003 to 2.5) and days with fever ($B=5$, $P<0.001$ CI 95% 2.4 to 7.6). In the group of ALLO transplants, patients with levels of ferritin above 1,500 $\mu\text{g/l}$ had a slightly higher frequency of severe mucositis, bacteraemia and days with fever, but these differences were not significant in univariate or in multivariate analysis.

Because there were very few C282Y homozygous (0) and C282Y/H63D compound heterozygous (2) patients in our sample, we were unable to study whether there was any relationship between this genetic variable and toxic-infectious complications.

Discussion

Mucositis is common after SCT and can be partly mediated by non-transferrin-bound iron (NTBI) during cytotoxic chemoradiotherapy, as has been observed in children undergoing chemotherapy for ALL [7]. Moreover, the

mechanisms involved in natural resistance to infection can only function successfully in an environment where the normal concentration of free ionic iron is about 10^{-18} M [5], which can be regarded as virtually zero. For this reason, hypoferrinaemia is a normal response to infection and appears to be part of a natural resistance mechanism [9]. As shown in experimental infection, bacterial virulence may increase when there is additional free iron in the medium [10]. In this context, increased TS and ferritin may be risk factors for the development of systemic bacterial and fungal infections in patients with haematological malignancies [12]. An increase in some late fungal infections, especially mucormycosis, has been reported in iron loaded patients after SCT [13]. Several articles have suggested that IO can increase infectious deaths in SCT [1, 2, 15].

In the present study, we found a clear relationship between pre-SCT ferritin levels and the three early toxic infectious complications studied. Moreover, a “dose effect” relationship was observed between the ferritin level and the appearance of severe mucositis and bacteraemia. Nevertheless, this relationship was fundamentally restricted to AUTO-transplanted patients. One explanation for this finding is that other important variables may influence the appearance of infection in ALLO-transplanted patients such as, for example, the graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis used or the appearance of GVHD and its treatment. We recently described a relationship between invasive *aspergillus* infection and body iron levels in transplanted patients [2], but this relationship was also especially intense in AUTO-transplanted patients. Interestingly, Miceli et al. [15] found a similar effect in a larger group of AUTO-transplanted patients.

Ferritin is an acute phase reactant and is not the method of reference to measure iron load, but a liver biopsy is difficult to perform in transplant patients, and non-invasive and accurate MRI-based methods to measure liver iron are not extensively available. In our opinion, the fact that all patients in this study were in CR OR and without chemotherapy treatment a minimum of 3 months before SCT suggests that levels of ferritin were a good estimator of body iron levels and were not significantly interfered by an “inflammatory state”.

We did not find any relationship between TS and the three toxic infectious complications studied. This result is surprising because it is generally accepted that NTBI is the biological form of iron directly related with promotion of toxicity and infection, and it has previously been demonstrated that it is precisely in patients with a $TS \geq 80\%$ in whom NTBI usually appears [16]. TS levels during conditioning and after transplant may perhaps be non-equivalent parameters, the first acting as a surrogate marker of early toxicity of the conditioning and the second directly related with the period of erythropoietic arrest after SCT [4].

These results support the hypothesis that iron burden can act as a chemical catalyser of free radicals, causing increased toxicity (mucositis) and promoting early infectious events in AUTO-transplanted patients. If these results are reproduced in future studies, pre-transplant manoeuvres to decrease IO [8] should be proposed to decrease adverse events and improve survival.

Acknowledgment This work was partially supported by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI-04/1120) and Agencia d'Avançament de Tecnologia i Recerca Mèdica (005/29/2004). This work complies with the current law of Spain inclusive of ethics approval.

References

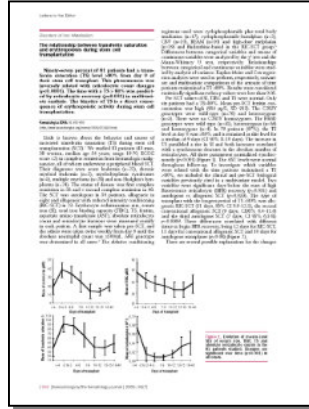
- Altes A, Remacha AF, Sureda A, Martino R, Briones J, Canals C, Brunet S, Sierra J, Giné E (2002) Iron overload might increase transplant-related mortality in haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 29:987–989
- Altes A, Remacha AF, Sarda P, Sancho FJ, Sureda A, Martino R, Briones J, Brunet S, Canals C, Sierra J (2004) Frequent severe liver iron overload after stem cell transplantation and its possible association with invasive aspergillosis. *Bone Marrow Transplant* 34:505–509
- Altes A, Ruiz A, Barceló MJ, Remacha AF, Puig T, Maya AJ, Castell C, Amate JM, Saz Z, Baiget M (2004) Prevalence of the C282Y, H63D, and S65C mutations of the HFE gene in 1,146 newborns from a region of Northern Spain. *Genet Test* 8:407–410
- Altes A, Remacha AF, Sarda P, Baiget M, Canals C, Sierra J (2006) The relationship between transferrin saturation and erythropoiesis during stem cell transplantation. *Hematologica* 91:992–993
- Bullen JJ, Rogers HJ, Griffiths E (1978) Role of iron in bacterial infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 80:1–35
- Bullen JJ (1981) The significance of iron in infection. *Rev Infect Dis* 3:1127–1138
- Camine TC, Evans P, Bruzelt G, Evans R, Handgretinger R, Niethammer D, Halliwell B (1995) Presence of iron catalytic for free radical reactions in patients undergoing chemotherapy: implications for therapeutic management. *Cancer Lett* 94:219–226
- de la Serna J, Bornstein R, García-Buena MJ, Lahuerta-Palacios JJ (1999) Iron depletion by phlebotomy with recombinant erythropoietin prior to allogeneic transplantation to prevent liver toxicity. *Bone Marrow Transplant* 23:95–97
- Ein RJ, Wolf SM (1974) The role of iron in nonspecific resistance to infection induced by endotoxin. *J Immunol* 112:737–745
- Griffiths E (1999) Iron in biological systems. In: Bullen JJ, Griffiths E (eds) *Iron and infection. Molecular, physiological and clinical aspects*. Wiley, Chichester, pp 1–26
- Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE (1992) Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 119:598–620
- Iglesias-Osma C, Gonzalez-Villaron L, San Miguel JF, Caballero MD, Vazquez L, de Castro S (1995) Iron metabolism and fungal infections in patients with haematological malignancies. *J Clin Pathol* 48:223–225
- Maertens J, Demuyck H, Verbeken EK, Zacher P, Verhoef GE, Vandenberghe P, Boogaerts MA (1999) Mucormycosis in allogeneic bone marrow transplant recipients: report of five cases and review of the role of iron overload in the pathogenesis. *Bone Marrow Transplant* 24:307–312

14. Martino R, Caballero MD, Canals C, Simon JA, Solano C, Urbano-Ispizua A, Bargay J, Rayon C, Leon A, Sarra J, Odricozola J, Conde JG, Sierra J, San Miguel J; ALLOPBSCT Subcommittee of the Spanish Group for Haematopoietic Transplantation (GETH); Group GEL-TAMO (2001) Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning: results of a prospective multicentre study. *Br J Haematol* 115:653–659
15. Miceli MH, Dong L, Grazzutti ML, Fassas A, Tertulien R, Van Rhee F, Barlogie B, Anassie EJ (2006) Iron overload is a major risk factor for severe infection after autologous stem cell transplantation: a study of 367 myeloma patients. *Bone Marrow Transplant* 37:857–864
16. Sahstedt L, Ebeling F, Bonsdorff L, Parkkinen J, Ruutu T (2001) Non-transferrin-bound iron during allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 113:836–838
17. Strasser SI, Kowdley KV, Sale GE, Mc Donald GB (1998) Iron overload in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 22:167–173

3.1.4. THE RELATIONSHIP BETWEEN TRANSFERRIN SATURATION AND ERYTHROPOIESIS DURING STEM CELL TRANSPLANTATION

*A. Altes, A.F. Remacha,
P. Sarda, M. Baiget,
C. Canals, J. Sierra*

Haematologica
2006;91:992-993



“Relación entre la saturación de transferrina y la eritropoyesis durante el trasplante de progenitores hematopoyéticos”

Resumen:

Introducción y Objetivos: Entre los años 1995 y 1997, tres grupos de investigadores analizaron el comportamiento de la sideremia y de la saturación de la transferrina durante el acondicionamiento del TPH, y observaron que ambos parámetros se elevaban muy pocos días antes de la infusión de progenitores y se mantenían elevados durante algunos días. Estos fenómenos también se describen en el

manuscrito 3. Sin embargo, quedaba por estudiarse cuál era exactamente el comportamiento temporal de este fenómeno, que relación mantenía con otros parámetros y, sobre todo, a qué se debe. Para algunos autores, la citolisis generada durante el acondicionamiento explicaría la liberación de hierro celular. Para otros, el efecto de la quimioradioterapia sobre el hígado castigaría la síntesis hepática de transferrina y explicaría en parte el fenómeno. Otra explicación sería que el bloqueo eritropoyético inducido por el acondicionamiento cierra el paso del hierro macrofágico al eritrón y promueve el acúmulo plasmático del hierro y la hipersaturación. El objetivo de este estudio fue revelar detalles sobre el comportamiento de estos parámetros durante el trasplante y determinar la causa del fenómeno.

Pacientes y Métodos: Se trata del mismo grupo de 81 pacientes descrito en el manuscrito 3, los cuales fueron evaluados en el pre-trasplante y de forma prospectiva post-trasplante dos veces cada semana, desde el día 0 hasta el momento del alta médica. Los pacientes estaban en remisión completa. En

cada evaluación se determinó la VSG, sideremia, capacidad de transporte de hierro, saturación de transferrina, ferritina, AST y el conteo absoluto de reticulocitos con cálculo de las fracciones de los mismos. Las diferencias entre variables categóricas se estudiaron mediante la prueba estadística de χ^2 , las diferencias entre medias con la prueba de la U de Mann-Whitney. Las relaciones entre variables categóricas y continuas con pruebas de análisis de la varianza. Se utilizó la prueba de Kaplan-Meier y la regresión de Cox para realizar comparaciones sobre el tiempo en que los pacientes mantenían una saturación de transferrina $\geq 80\%$. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos si los valores de P eran < 0.05 .

Resultados: Los valores de sideremia, capacidad de transporte de hierro y saturación de transferrina pre-trasplante fueron normales en general. Sólo 6 pacientes presentaban una saturación de transferrina superior al 80%. Sin embargo, el 97% de los pacientes alcanzaron un nivel de saturación de transferrina superior al 80% en el día 0, y este parámetro se mantenía por encima de este valor una mediana de

9 días (IC 98% 8-10). Este fenómeno estaba inversamente relacionado con la evolución de la cuenta de reticulocitos ($P < 0.0001$) (ver Figura 1 del artículo original). Sideremia, capacidad y reticulocitos retornaban a niveles normales sincrónicamente. Los niveles de AST se mantuvieron normales durante todo el proceso. El tiempo hasta que se producía la recuperación periférica de reticulocitos predecía el tiempo en que el paciente mantenía una saturación de la transferrina superior al 80% en el análisis multivariado ($P = 0.031$). El tiempo en que los pacientes mantenían una saturación de transferrina $> 80\%$ era mayor en los trasplantes alogénicos de intensidad reducida que en los alogénicos convencionales, y mayor en éstos que en los autotransplantes (11, 9 y 7 días respectivamente). Estas diferencias correlacionaron con el tiempo en reestablecer la producción de serie roja en los tres tipos de trasplante (ver figura 2 del artículo).

Conclusiones: Dado que todos los pacientes estaban en remisión completa no se puede achacar los fenómenos estudiados a citolisis tumoral. La citolisis hepática también se puede excluir, dado que los niveles de AST se

mantuvieron normales. A pesar que se observaron descensos en los niveles de capacidad de transporte de hierro, éstos no coincidían con los momentos en que la saturación de transferrina era máxima. La sincronía de los fenómenos estudiados con los cambios en las cifras de reticulocitos prueban que la causa de las grandes elevaciones de sideremia y saturación de la transferrina durante el acondicionamiento del trasplante es el bloqueo eritropoyético inducido por el tratamiento. Por tanto, el comportamiento de la saturación de la transferrina post-trasplante es una consecuencia directa de la actividad eritropoyética durante el trasplante de progenitores hematopoyéticos.

NOTA: MANUSCRITO ANEXO – PARTE NO FUNDAMENTAL

Este artículo no fue aceptado por la subcomisión de postgrado de la comisión de asuntos académicos por ser una carta científica y no un artículo original. No obstante, su presentación se admitió puesto que los datos que en él se detallan son básicos para un conocimiento evolutivo y racional de la sucesión de trabajos de esta tesis doctoral.

The relationship between transferrin saturation and erythropoiesis during stem cell transplantation

Ninety-seven percent of 81 patients had a transferrin saturation (TS) level >80% from day 0 of their stem cell transplant. This phenomenon was inversely related with reticulocyte count changes ($p < 0.0001$). The time with a TS > 80% was predicted by reticulocyte recovery ($p = 0.031$) in multivariate analysis. The kinetics of TS is a direct consequence of erythropoietic activity during stem cell transplantation.

Haematologica 2006; 91:992-993

(<http://www.haematologica.org/journal/2006/07/992.html>)

Little is known about the behavior and causes of increased transferrin saturation (TS) during stem cell transplantation (SCT).¹ We studied 81 patients (43 men, 38 women, median age 54 years, range 19-70, ECOG score ≤ 2) in complete remission from hematologic malignancies, all of whom underwent a peripheral blood SCT. Their diagnoses were acute leukemia ($n=22$), chronic myeloid leukemia ($n=2$), myelodysplastic syndromes ($n=5$), multiple myeloma ($n=29$) and non-Hodgkin's lymphoma ($n=24$). The status of disease was first complete remission in 33 and \geq second complete remission in 48. The SCT was autologous in 50 patients, allogeneic in eight and allogeneic with reduced-intensity conditioning (RIC-SCT) in 23. Erythrocyte sedimentation rate, serum iron (SI), total iron binding capacity (TIBC), TS, ferritin, aspartate amino transferase (AST), absolute reticulocyte count and reticulocyte fractions were measured serially in each patient. A first sample was taken pre-SCT, and the others were taken twice weekly from day 0 until the absolute neutrophil count was $\geq 500/\mu\text{L}$. HFE genotype was determined in all cases.² The ablative conditioning

regimens used were cyclophosphamide plus total body irradiation ($n=17$), cyclophosphamide-busulfan ($n=2$), CBV ($n=10$), BEAM ($n=10$) and high-dose melphalan ($n=19$) and fludarabine-based in the RIC-SCT group.³ Differences between categorical variables and means of continuous variables were analyzed by the χ^2 test and the Mann-Whitney U test, respectively. Relationships between categorical and continuous variables were studied by analysis of variance. Kaplan-Meier and Cox regression analyses were used to perform, respectively, univariate and multivariate comparisons of the amount of time patients maintained a TS $\geq 80\%$. Results were considered statistically significant when p values were less than 0.05.

Pre-SCT values of SI, TIBC and TS were normal. Only six patients had a TS >80%. Mean pre-SCT ferritin concentration was high (96.4 $\mu\text{g/L}$, SD 91.3). The C282Y genotypes were wild-type ($n=76$) and heterozygous ($n=5$). There were no C282Y homozygotes. The H63D genotypes were wild type ($n=41$), heterozygous ($n=36$) and homozygous ($n=4$). In 79 patients (97%), the TS level at day 0 was >80% and it remained at this level for a median of 9 days (CI 95% 8-10 days). The increase in TS paralleled a rise in SI and both increases correlated with a synchronous decrease in the absolute number of reticulocytes. All three parameters normalized synchronously ($p < 0.001$) (Figure 1). The AST levels were normal throughout follow-up. To investigate which variables were related with the time patients maintained a TS >80%, we included the clinical and pre-SCT biological variables previously cited in a multivariate model. Two variables were significant: days before the start of high fluorescence reticulocyte (HFR) recovery ($p=0.031$) and autologous vs allogeneic SCT ($p=0.033$). The type of transplant with the longest period of TS >80% was allogeneic RIC-SCT (11 days, 95% CI 9.9-12.1), the second conventional allogeneic SCT (9 days, CI 95% 6.4-11.6) and the third autologous SCT (7 days, CI 95% 6.1-8); $p=0.0009$. These differences correlated with different times to begin HFR recovery, being 12 days for RIC-SCT, 11 days for conventional allogeneic SCT and 10 days for autologous transplants ($p=0.08$) (Figure 2).

There are several possible explanations for the changes

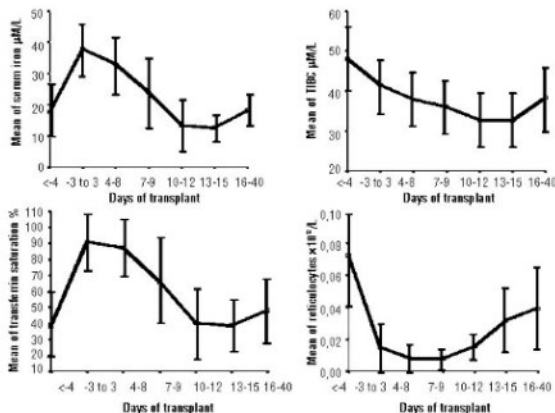


Figure 1. Evolution of means (and SD) of serum iron, TIBC, TS and absolute reticulocyte counts in the 81 patients studied. Changes are significant over time ($p < 0.001$) in all cases.

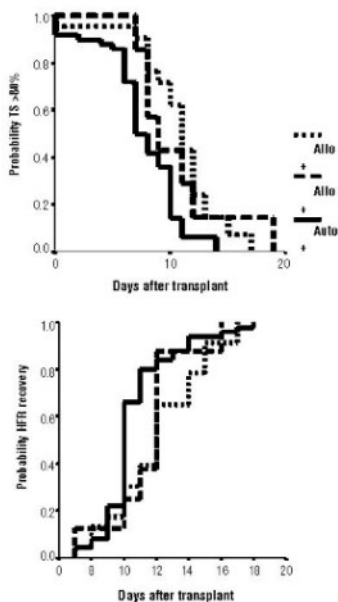


Figure 2. Graph showing probability of TS > 80% and days to recovery of high fluorescence reticulocytes (HFR) according to the type of transplant (autologous: continuous line, conventional allogeneic: dashed line, allo RI-SCT: clotted line). $p=0.0009$ and $p=0.08$, respectively.

in TS during SCT: inhibition of erythropoiesis, tumor cell destruction, a decrease in transferrin synthesis and liver cell damage with a release of iron stores.⁴ In our study, only the first cause was responsible for the TS increase. All our patients were in complete remission, thereby excluding tumor cell destruction as a cause. AST levels remained normal throughout the process, ruling out significant liver cytotoxicity. Although a TIBC decrease was observed, this change was not present during the first week when the maximum rise in TS occurred. Erythropoiesis is the main physiological acceptor of daily-recycled body iron and its suppression by chemotherapy stops clearance and utilization of transferrin-bound iron leading to raised TS. The mirror image of the graphs showing TS and absolute reticulocyte counts plotted against time supports this hypothesis (Figure 1). Erythropoietic activity in these patients starts 6-7 days before the HFR rise in peripheral blood (bone marrow transit time), exactly when TS declines. The number of days before HFR recovery begins predicts the

number of days with TS > 80% ($p=0.03$). Our results agree with those of Bradley *et al.* using conventional chemotherapy and other methods.⁵ TS levels < 80% and erythropoiesis recovered earlier following autotransplants than following allotransplants ($p=0.033$, RR=1.75). An inhibition of erythropoietin secretion has been attributed to the use of cyclosporine.^{6,7} This effect can be maximum in RIC-SCT. Cyclosporine is started on day -7 in this transplant modality, and not on day -1 as usual. TS changes after conditioning seem to be independent of body iron. Measures to control TS should be directed towards stimulating erythropoiesis or TIBC with transferrin infusions.⁸ Measures to decrease iron overload⁹ will probably be unsuccessful.

Albert Añes,* Angel Francisco Remacha,* Pilar Sanja,*
Montserrat Baiget,* Carme Canals,* Jordi Sierra*

*Hematology Department, *Genetics Service, Hospital de Sant Pau, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain

Funding: this work was partially supported by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI-04/1120) and Agencia d'Avaluació de Tecnologia i Recerca Mèdica (005/29/2004).

Key words: iron overload, iron metabolism, hematopoietic stem cell transplantation, erythropoiesis.

Correspondence: Albert Añes MD, Servei de Laboratori, Hospital de l'Esperit Sant, Avda Mossèn Pons i Rabada s/n 08925 Santia Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain. Phone: international +34 9 33860202 Ext. 420. Fax: international +34 9 35677568. E-mail: aanes@hes.scs.es

References

- Sahlstedt L, Ebeling E, Bonsoff L, Parkkinen J, Ruutu T. Non-transferrin-bound iron during allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2001;115:836-8.
- Añes A, Ruiz A, Barceló MJ, Remacha AF, Fuig T, Maysa AJ, et al. Prevalence of the C282Y, H63D, and S65C mutations of the HFE gene in 1,146 newborns from a region of Northern Spain. *Gen Test* 2004;8:407-10.
- Martino R, Caballero MD, Canals C, Simon JA, Solano C, Urbano-Ispizua A, et al. ALLORECT Subcommittee of the Spanish Group for Hematopoietic Transplantation (GEHT): Group GEL-TAM0. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning: results of a prospective multicentre study. *Br J Haematol* 2001;115:653-9.
- Evens AM, Mehta J, Gordon LR. Rust and corrosion in hematopoietic stem cell transplantation: the problem of iron and oxidative stress. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34:561-71.
- Bradley SJ, Gostiwitana J, Stichairatanakool S, Hider RC, Porter JB. Non-transferrin-bound iron induced by myeloablative chemotherapy. *Br J Haematol* 1997;99:337-43.
- Vannuchi AM, Grossi A, Bosi A, Rafanelli D, Guidi S, Secchi R, et al. Impaired erythropoietin production in mice treated with cyclosporin A. *Blood* 1991;78:1615.
- Vannuchi AM, Grossi A, Bosi A, Rafanelli D, Stetler M, Guidi S, et al. Effects of cyclosporin A on erythropoietin production by the human Hep3B hepatoma cell line. *Blood* 1993; 82:978.
- Sahlstedt L, von Bonsdorff L, Ebeling E, Ruutu T, Parkkinen J. Effective binding of free iron by a single intravenous dose of human apotransferrin in hematological stem cell transplant patients. *Br J Haematol* 2002;119:547-53.
- de la Serna J, Borque R, García-Bueno MJ, Lahuerta-Falacios JJ. Iron depletion by phlebotomy with recombinant erythropoietin prior to allogeneic transplantation to prevent liver toxicity. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:95-7.

Los trabajos que constituyen esta tesis fueron pioneros en su área de conocimiento. Como se ha explicado en la introducción, los datos disponibles relativos al metabolismo del hierro durante el TPH eran muy escasos al inicio de estos estudios, incluso a un nivel puramente descriptivo. La escasez de información previa explica que, en general, el número de pacientes reclutados en estos trabajos no es muy amplio. Resulta difícil o incluso inconveniente reclutar una gran cantidad de pacientes procedentes de diversas instituciones para investigar algo sobre lo que conocemos muy poco, con el riesgo de no obtener resultados positivos o científicamente relevantes. En definitiva, estos trabajos resultaron pioneros en sus conclusiones, pero a costa de que dichas conclusiones fueran orientativas y no definitivas. El interés de estas conclusiones es el de alentar a la realización de nuevos proyectos de más calado, generar nuevas hipótesis de trabajo y en definitiva, encauzar la investigación en una nueva área del trasplante hematopoyético, y en este sentido han cumplido su misión.

La sobrecarga férrica ha demostrado su toxicidad en diversas situaciones, fundamentalmente en los pacientes con hemocromatosis hereditaria y en la sobrecarga férrica transfusional secundaria a anemias crónicas hereditarias. Los médicos que realizan trasplantes hematopoyéticos en niños con talasemia mayor han tenido siempre muy en cuenta la acumulación de hierro como factor pronóstico en sus pacientes y la importancia de eliminar dicha sobrecarga tras el trasplante. Esto ha sido así porque conocían bien los terribles efectos de la sobrecarga de hierro en esta población. Sin embargo, la sobrecarga férrica aunque se suponía frecuente en los pacientes tras poliquimioterapia nunca se tuvo muy en cuenta en los pacientes que llegaban al trasplante. Vamos a discutir los resultados obtenidos en relación con los objetivos propuestos.

Objetivo 1; frecuencia e intensidad de la sobrecarga bioquímica de hierro en los pacientes a los que se practica un TPH: De todos los manuscritos comentados se desprende que la sobrecarga férrica es muy frecuente en los pacientes que van a ser

tratados con un TPH. En el primer manuscrito; 12 de 25 pacientes presentaban unos niveles de ferritina $\geq 3000 \mu\text{g/l}$ al inicio del TPH o una saturación de transferrina $\geq 100\%$ en el día -4 . Además se demuestra en el mismo trabajo que los niveles elevados de ferritina se corresponden con el número de transfusiones recibidas. Sin embargo, en este artículo queda claro que los factores que rigen la elevación de la saturación de transferrina durante el TPH no son los mismos que determinan la elevación de ferritina. En el tercer manuscrito, 38 de 81 pacientes (47%) presentaban un nivel de ferritina superior a $850 \mu\text{g/l}$ al inicio del trasplante y 19 (23%) superior a $1500 \mu\text{g/l}$, eso sin poder esgrimir factores de confusión inflamatorios o tumorales, dado que todos los pacientes se hallaban en RC y más de tres meses sin quimioterapia.

La principal crítica que se puede ofrecer a estos resultados es que todos ellos se basan en los niveles de ferritina sérica, un marcador indirecto de sobrecarga férrica. El método de referencia para medir la cantidad corporal de hierro es el análisis bioquímico del tejido hepático obtenido por biopsia. Este método no

está exento de morbi-mortalidad y su práctica se juzgó inadmisibile en pacientes con un estado general y hemostasia deteriorados. Por otra parte, los métodos de medición del hierro corporal mediante resonancia magnética nuclear se hallaban todavía en fase experimental en el momento de realizar estos estudios. No obstante, datos más recientes indican que la estimación de la sobrecarga corporal de hierro mediante la medición del nivel de la ferritina sérica es adecuada en este tipo de pacientes. En este sentido, un equipo francés ha estudiado la sobrecarga férrica presente en un grupo de 65 pacientes trasplantados mediante resonancia magnética nuclear (Ch. Rose y col, 2007). En este grupo de pacientes, 38 (58%) presentaban valores anormalmente altos de ferritina. Se estudió por RMN 32 de estos casos y la concentración hepática de hierro fue elevada en 31/32 casos. La media de concentración de hierro hepática fue en este grupo de 117 $\mu\text{mol/gr}$. La correlación entre las unidades de sangre transfundidas y la concentración hepática de hierro medida por RMN fue $R= 0.84$, y con la ferritina de $R= 0.81$. Por otra parte, el grupo de Arkansas de trasplante en

mieloma ha demostrado también que la sobrecarga férrica es muy prevalente en los pacientes autotrasplantados. En un estudio con 367 pacientes que necesitaban un trasplante de progenitores hematopoyéticos, 139 (38%) presentaban sobrecarga férrica. Dicha sobrecarga se midió en médula ósea mediante un método morfológico y semicuantitativo (Miceli MH y col, 2006).

Objetivos 2 y 3; seguimiento de los parámetros férricos durante el TPH y determinación de la causa de elevación de la saturación de transferrina: En los manuscritos tercero y cuarto se ha seguido con precisión la evolución de los parámetros férricos durante el acondicionamiento, y sobre todo el más intrigante, la evolución de la saturación de la transferrina. Previamente a estos trabajos se había descrito que un porcentaje muy alto de los pacientes en los que se practicó un TPH presentaban una tremenda elevación de la saturación de la transferrina durante el acondicionamiento, con aparición de hierro libre en aquellos con saturación $\geq 80\%$. Sin embargo no se conocía con precisión en qué porcentaje de pacientes se daba este

fenómeno. También se desconocía si este comportamiento de la saturación de transferrina se daba en todo tipo de trasplante y con idéntico patrón, cuánto tiempo duraba el trastorno, a qué se debía y si este fenómeno producía algún impacto tóxico o infeccioso. El cuarto manuscrito demuestra que el 97% de los pacientes (la práctica totalidad) presentan una elevación de la saturación de la transferrina superior al 80% en algún momento del trasplante (y por tanto es lógico pensar que todos ellos generan hierro libre en mayor o menor medida). La figura 2 del mismo manuscrito nos da la cinética de dicha elevación y el tiempo medio de duración según el tipo de trasplante, que en general es de 9 días pero que es algo menor en los autotrasplantes y algo mayor en los trasplantes con acondicionamiento de intensidad reducida. Se demuestra además que esta elevación no tiene que ver con la sobrecarga férrica del paciente ni con fenómenos ligados a citolisis, sino con el stop eritropoyético y, por tanto, dura lo que dura éste. Por último, en el tercer manuscrito se demuestra que ni los valores de saturación pre-trasplante ni el tiempo durante el cual el

paciente mantiene niveles muy elevados de saturación de transferrina tienen impacto alguno en la toxicidad o infección precoz. A la luz de los resultados expuestos, algunas estrategias propuestas como la administración de transferrina durante las fases precoces del trasplante no parecen útiles. Hasta la fecha, estos datos no han sido todavía reproducidos o refutados por otros investigadores.

Objetivo 4; análisis del impacto en la toxicidad precoz de la sobrecarga férrica: En el manuscrito 3 se demuestra que la sobrecarga férrica pre-trasplante (medida como ferritina sérica) influye en parámetros de toxicidad-infección precoz, tales como mucositis grave, días de fiebre y número de bacteriemias. Por tanto debe concluirse que la sobrecarga férrica producida por las múltiples transfusiones pre-trasplante van a representar un importante factor de riesgo de toxicidad precoz muy a tener en cuenta. El trabajo ya citado del grupo de mieloma de Arkansas (Miceli MH y col, 2006) coincide exactamente en este tema. En su casuística, 62/139 (45%) pacientes con sobrecarga férrica (definida mediante un método morfológico y en médula ósea) presentaron

infección precoz durante un trasplante autólogo por mieloma, mientras que sólo 54/228 (24%) presentaron infección en el grupo de pacientes sin sobrecarga férrica ($P < 0.0001$). Estas diferencias se mantuvieron en el análisis multivariante.

● **Objetivo 5; frecuencia y gravedad de la sobrecarga férrica en los pacientes que mueren tras TPH:** En el segundo manuscrito, el 70% de los pacientes muertos tras un TPH presentaban una concentración hepática de hierro muy elevada, superior a $100 \mu\text{mol/g}$, y el índice de hierro hepático era superior a 1.9 en el 83% de los pacientes. Estos datos demuestran que en la mayoría de pacientes que mueren tras un TPH, la sobrecarga férrica además de ser frecuente es tremendamente grave. La metodología empleada hace difícil la crítica de esta conclusión.

● **Objetivo 6; determinación de asociaciones entre sobrecarga férrica en pacientes muertos tras TPH y causa de muerte:** En el segundo manuscrito se detecta por primera vez en la literatura, la existencia de una asociación entre la sobrecarga férrica medida mediante cuantificación bioquímica de la biopsia hepá-

tica con la muerte por aspergilosis invasiva. Esta asociación se daba fundamentalmente en los receptores de trasplantes autólogos. Una explicación a este último dato es que los receptores de TPH autólogo tienen menos factores de riesgo para infección por aspergilosis invasiva, y quizá en este caso la sobrecarga de hierro juega un papel más determinante. Recientemente, un grupo de investigadores del Hospital M.D. Anderson de Houston (Kontoyiannis DP y col, 2007) han obtenido datos similares. Este grupo realizó un estudio retrospectivo con dos grupos de pacientes con leucemia o TPH alogénico, uno de ellos con infección por aspergillus y el otro sin (control). Ambos grupos constaban de 33 pacientes y eran comparables en cuanto a sus características clínicas y al respecto de los factores de riesgo clásicos de infección por aspergillus (tipo y estado de la enfermedad, realización de alo-TPH, días de neutropenia, presencia de EICH, dosis acumulada de corticosteroides, comorbilidades, infección por citomegalovirus). A todos ellos se les valoraron los depósitos férricos en médula ósea pre-tratamiento y se subclasificaron según este

dato (índice de hierro medular 0-2 vs 3-4). Mientras que el 70% de los pacientes con infección por aspergillus tenían un índice de hierro medular superior o igual a 3, en el grupo control sólo un 16% tenía un índice de hierro medular pre-TPH superior o igual a 3 ($P < 0.0001$). Las diferencias se mantuvieron en el análisis multivariante.

Es de destacar que según nuestros datos, en los pacientes que mueren tras TPH no existen otras asociaciones entre la sobrecarga férrica y otras causas de muerte como infecciones bacterianas o virales, EICH o enfermedad veno-oclusiva hepática.

● **Objetivo 7; estudio de la asociación entre sobrecarga férrica y mortalidad del TPH:** La principal conclusión del primer manuscrito es que los pacientes con mayor sobrecarga férrica presentan una menor supervivencia global, y ello es debido a una mayor TRM. Este trabajo fue el primero en que se detectó esta asociación. La crítica más importante que puede ofrecerse a este estudio es el escaso número de pacientes incluidos. No obstante, la presencia de pacientes en este estudio con muy alta concentración corporal de hierro

facilitó la obtención de resultados positivos. Finalmente, en el año 2007 el grupo de oncología médica del Dana-Farber Institute corroboró nuestras impresiones iniciales y en un grupo de 590 pacientes tratados con trasplante alogénico mieloablativo. En concreto, se demostró que la TRM incrementaba en relación con los niveles de ferritina pre-trasplante en los pacientes con diagnóstico inicial de leucemia aguda o SMD (Armand Ph y col, 2007). En concreto, para los pacientes con SMD el incremento de TRM para niveles de ferritina superiores al cuarto cuartil fue de 2.6 (P= 0.003) y de 1.6 para los pacientes con leucemia aguda (P= 0.031). Sin embargo, el riesgo de recaída se mantenía invariable (figura 17). Estos datos soportaban el análisis multivariante.

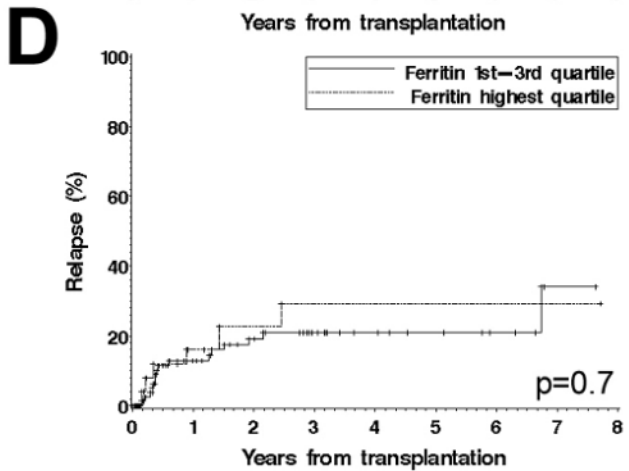
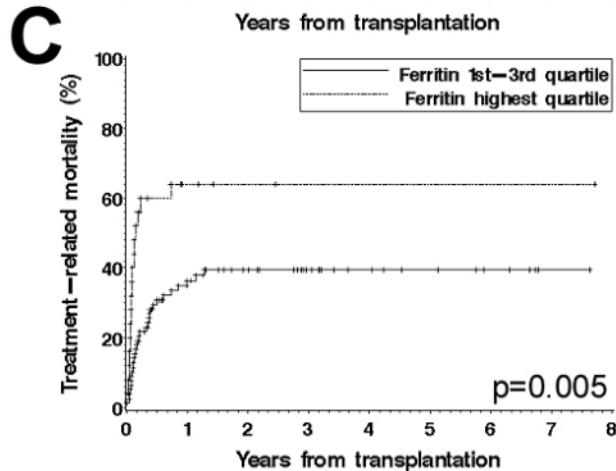
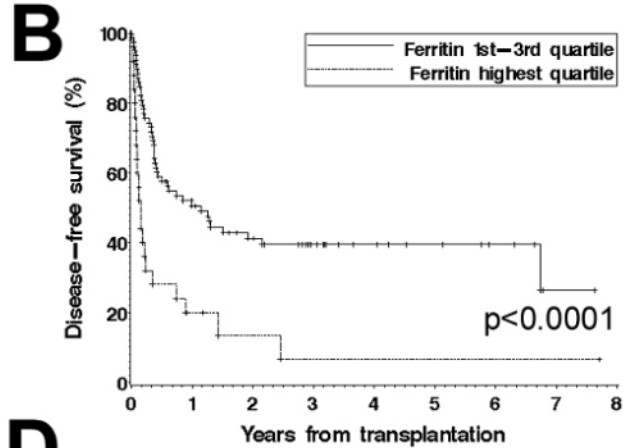
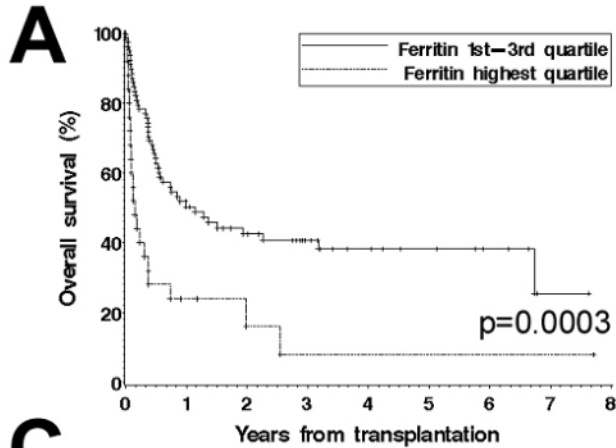


Figura 17. Supervivencia de los pacientes con SMD estratificados según los niveles de ferritina pre-TPH. (A) Supervivencia global; (B) Supervivencia libre de recaída; (C) Incidencia acumulada de la TRM; (D) Incidencia acumulada de recaída.

Conclusiones

- La sobrecarga férrica es un trastorno metabólico que se da muy frecuentemente en los pacientes antes y después del trasplante de progenitores hematopoyéticos. La media de ferritina de los pacientes antes del trasplante es de 954 $\mu\text{g/l}$ en la serie más amplia de pacientes, y por tanto muy elevada. Dicha sobrecarga férrica se halla en relación directa con el número de transfusiones previamente recibidas.
- La práctica totalidad de pacientes muertos tras trasplante hematopoyético presentan una concentración de hierro hepático muy elevada (media 138 $\mu\text{mol/g}$, rango 31-631), y más del 80% tienen un índice de hierro hepático superior a 1.9. Téngase en cuenta que el rango normal de la concentración de hierro hepático es de 13 ± 8 $\mu\text{mol/g}$.
- La gran elevación de la saturación de transferrina durante el acondicionamiento del TPH es debida al bloqueo eritropoyético, y se mantiene en función de éste. La práctica totalidad de los pacientes presentan

valores de saturación superiores al 80% y posiblemente hierro libre. El tiempo en que se mantiene esta situación es variable en cada paciente, pero menor en los trasplantes autólogos, intermedio en los alogénicos ablativos y más alto en los alogénicos no ablativos. El tiempo que se mantienen estas cifras tan altas de saturación no parece tener impacto en la morbilidad precoz del trasplante.

- La sobrecarga férrica pretrasplante (nivel de ferritina $\geq 1500 \mu\text{g/l}$) influye en el porcentaje de pacientes con mucositis grave, número de bacteriemias y días en que los pacientes tienen fiebre. Por tanto se asocia a morbilidad precoz.
- Los pacientes con concentración de hierro hepático $\geq 150 \mu\text{mol/g}$ tienen una mayor probabilidad de morir por infección fúngica diseminada por aspergillus. Esto es cierto sobretodo en los pacientes autotrasplantados. Controlar esta variable puede ser útil para prevenir esta infección.

-
- Los pacientes con gran sobrecarga férrica pre-trasplante (ferritina $\geq 3000 \mu\text{g/l}$) tienen mayor TRM y menor supervivencia asociadas. No obstante, no se deriva de estos estudios que la sobrecarga férrica sea la causa de dicho fenómeno. Es dudoso el valor que puede tener el grado de saturación de transferrina en cuanto a la supervivencia de los pacientes. Únicamente se ha determinado valor pronóstico en los valores de saturación de transferrina ≥ 100 en el día -4 del acondicionamiento de los trasplantes acondicionados con ciclofosfamida / ICT.

Bibliografía



Aisen P. The transferrins. In A Jacobs and M Worwood (Eds)
Iron in Biochemistry and Medicine
1980 Vol II pp 87-129. Academic Press. London

Altes A. Hemocromatosis En Carreras E, Sanz MA (Eds)
Manual Práctico de Hematología Clínica.
2ª ed. Barcelona ,Antares 2005.

Andrews NC.
Disorders of iron metabolism.
N Engl J Med 1999;341:1986-95

*Andrews SC, Arosio P, Bottke W, Briat JF, von Dari M,
Harrison PM, Laulhere JP, Levi S, Lobreaux S, Yewdale SJ.*
Structure, function and evolution of ferritins.
Journal of Inorganic Biochemistry 1992;47:161-174

Arija V, Viteri F.
Deficiencias de nutrientes conducentes a anemia, su preven-
ción y tratamiento.
En: Serra LL, Aranceta J. Nutrición y salud pública 2ª ed.
Barcelona: Masson; 2006. p. 393-705

*Armand PH, Kim HT, Cutler CS, Ho VT, Koreth J, Alyea EP,
Soiffer RJ, Antin JH.*
Pronostic impact of elevated pre-transplant serum ferritin in
patients undergoing myeloablative stem cell transplantation.
Blood 2007;109:4586-4588

Baker EN, Lindley PF.

New perspectives on the structure and functions of transferrin.

Journal of Inorganic Biochemistry 1992;47:147-160

Bezkorovainy A.

Biochemistry of Non-Heme Iron.

1980 Plenum Press, New York

Bradley SJ, Gosriwitana I, Srichairatanakool S, Hider RC, Porter JB.

Non-transferrin-bound iron induced by myeloablative chemotherapy

British Journal of Haematology 1997;99:337-343

Bullen JJ, Cushnie GH, Rogers HJ.

The abolition of the protective effect of Clostridium welchii type A antiserum by ferric iron.

Immunology 1967;12:303-312

Bullen JJ, Leigh LC, Rogers HJ.

The effect of iron compounds on the virulence of Escherichia coli for guinea pigs.

Immunology 1968;15:581-588

Bullen JJ, Wilson AB, Cushnie GH, Rogers HJ.

The abolition of the protective effect of Pasteurella sceptica antiserum by iron compounds.

Immunology 1968;14:889-898

Bullen JJ, Rogers HJ, Griffiths E.

Role of iron in bacterial infection.

Current Topics in Microbiology and Immunology 1978;80:1-35

Bullen JJ

The significance of iron in infection.

Reviews of Infectious Diseases 1981;3:1127-1138

Bullen JJ, Spalding PB, Ward CG, Gutteridge JMC.

Hemochromatosis, iron and septicemia caused by *Vibrio vulnificus*.

Archives of Internal Medicine 1991;151:1606-1609

Bullen JJ, Ward CG, Rogers HJ.

The critical role of iron in some clinical infections.

European Journal of Clinical Microbiology 1991;10:613-617

Bullen JJ, Spalding PB, Ward CG, Rogers HJ.

The role of Eh, pH and iron in the bactericidal power of human plasma.

FEMS Microbiology Letters 1992;94:47-52

Burt RB, Wilson WH.

Conditioning (preparative) regimens.

En: Burt RK, Deeg HJ, Santos GW(eds) On call in Bone marrow Transplantation. New York: Chapman and Hall;

1996; p. 94-108

Calver GA, Kenny CP, Lavergne G.

Iron as a replacement for mucin in the establishment of meningococcal infection in mice.

Canadian Journal of Microbiology 1976;22:832-838

Garmine TC, Evans P, Bruchelt G, Evans R, Handgretinger R, Niethammer D, Halliwell B.

Presence of iron catalytic for free radical reactions in patients undergoing chemotherapy: implications for therapeutic management.

Cancer Lett. 1995;94:219-26

Carlsson J, Hofling JF, Sundqvist GK.

Degradation of albumin, haemopexin, haptoglobin and transferrin by black-pigmented *Bacteroides* species.

Journal of Medical Microbiology 1984;18:39-46

Cornelissen CN, Sparling PF.

Iron piracy: acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens.

Molecular Microbiology 1994;14:843-850

Conrad ME, Umbreit JN, Moore EG, Uzel C, Berry MR.

Alternate iron transport pathway.

J Biol Chem 1994;269:7169-7173

Cowart RE, Foster BG.

Differential effects of iron on the growth of *Listeria monocytogenes* : Minimum requirements and mechanisms of acquisition.

Journal of Infectious Diseases. 1985;151:721-730

Crichton RR, Charloteaux-Wauters M.

Iron transport and storage.

European Journal of Biochemistry 1987 ;164 :485-506

Crichton RR (1990).

Proteins of iron storage and transport.

Advances in Protein Chemistry 1990;40:281-363

Crosa JH.

A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* specifies an iron sequestering system.

Nature 1980;284:566-568

Crosa JH.

Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria.

Microbiological Reviews 1989;53:517-530

Chengappa MM.

Hemoglobin enhancement of experimental infections of mice with *Pasteurella haemolytica*.

American Journal of Veterinary Research. 1983;44:1545-1546

Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J et al.

Positional cloning of zebrafish ferroportin 1 identifies a conserved vertebrate iron exporter.

Nature 2000;403:776-81

Durken M, Nielsen P, Knobel S, Finckh B, y col.

Nontransferrin-Bound iron in serum of patients receiving bone marrow transplants.

Free Radical Biology & Medicine 1997;22:1159-1163

Finch CA, Huebers H, Eng M, Miller L.

Effect of transfused reticulocytes on iron exchange.

Blood 1982;59:364-369

Finch CA, Huebers HA, Cazzila M, Bergamaschi G, Belloti V.

Storage iron.

In: Albertini A, Arosio P, Chiancone E, Crysdale J, eds. Ferritins and isoferritins as biochemical markers. Amsterdam: Elsevier;1984. p. 3-21

Finch CA, Belloti V Stray S.

Plasma ferritin determination as a diagnostic tool.

West J Med 1986;145:657-663

Finkelstein RA, Sciortino CV, McIntosh MA.

Role of iron in microbe-host interactions.

Reviews of infectious diseases 1983;5:5759-5776

Ford A, Hayhoe JPV.

An investigation of alternatives to hog gastric mucin as virulence enhancing agents in the cholera vaccine potency assay.

Journal of Biological Standards 1976;4:353-366

Forsberg CM, Bullen JJ.

The effect of passage and iron on the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*.

Journal of Clinical Pathology 1972;25:65-68

Ganz T.

Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation.

Blood 2003;102:783-788

Giardina B, Messina I, Scatena R, Castagnola M.

The multiple functions of haemoglobin.

Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 1995;30:165-196

Gimferrer E, Ubeda J, Royo MT.

El receptor de la transferrina.

Bioferrum 1996;1:49-50

Gladstone GP, Walton E.

The effect of iron and haematin on the killing of staphylococci by rabbit polymorphs.

British Journal of Experimental Pathology 1971;52:452-464

Goldman J, Schmitz N, Niethammer D, Gratwohl A.

Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumors and immune disorders: current practice in Europe in 1998.

Bone Marrow Transplant 1998;21:1-7

Gordon LI, Brown SG, Tallman MS, Rademaker AW y col.

Sequential changes in serum iron and ferritin in patients undergoing high-dose chemotherapy and radiation with autologous bone marrow transplantation: possible implications for treatment related toxicity.

Free Radical Biology & Medicine 1995;18:383-389

Gray-Owen SD, Schryvers AB.

Bacterial transferrin and lactoferrin receptors.

Trends in Microbiology 1996;4:185-190

Griffiths E.

Availability of iron and survival of bacteria in infection.

In CSF Easmon, M Brown and PA Lambert (Eds) Medical Microbiology 1983 Vol 3, pp. 150-177. Academic Press. London

Griffiths E.

Iron and bacterial virulence – a brief overview.

Biology of Metals 1991;4:7-13

Halliwell B, Gutteridge JMC.

Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Meth Enzymol 1990;186:1-85

Harrison PM, Arosio P.

The ferritins: Molecular properties, iron storage and cellular regulation.

Biochimica et Biophysica Acta 1996;1275:161-203

Harrison P, Neilson JR, Marwah SS, Madden L, Bareford D, Milligan DW.

Role of non-transferrin bound iron in iron overload and liver dysfunction in long term survivors of acute leukaemia and bone marrow transplantation.

J Clin Pathol. 1996;49:853-6

Henderson LC, Kadis S, Chapman Jr WL.

Influence of iron on *Corynebacterium renale*-induced pyelonephritis in a rat experimental model.

Infection and Immunity 1978;21:540-545

Hernández C, Genesca J, Ignasi JE, García L, Simó R.

Relación entre reserva de hierro y diabetes mellitus en pacientes con infección por virus de la Hepatitis C: un

estudio de casos y controles.

Med Clin (Barc) 2000; 115:21-22

Huebers HA, Finch CA.

The physiology of transferrin and transferrin receptors.

Physiol Rev 1987;67:520-82

Huisman TH.

The structure and function of normal and abnormal haemoglobins.

Baillières Clinical Haematology 1993;6:1-30

Hunter RL, Bennett B, Towns M, Vogler W.

Transferrin in Disease: Defects in the regulation of transferrin saturation with iron contribute to susceptibility to infection.

Am J Clin Pathol 1984;81:748-753

Iglesias-Osma C, Gonzalez-Villaron L, San Miguel JF, Caballero MD, Vazquez L, de Castro S.

Iron metabolism and fungal infections in patients with haematological malignancies.

J Clin Pathol 1995; 48:223-225

Jackson S, Burrows TW.

The virulence-enhancing effect of iron on non-pigmented mutants of virulent strains of Pasteurella pestis.

British Journal of Experimental Pathology 1956;37:577-583

Jacobs A.

Ferritin: An interim review.

Curr top hematol 1985;15:25-62

De Jong G, van Dijk JP, van Eijk HG.

The biology of transferrin.

Clinica Chemica Acta 1990;190:1-46

Kaye D, Merselis Jr JC, Hook EW.

Influence of Plasmodium berghei infection on susceptibility to Salmonella infection.

Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine 1965;120:810-813

Klopper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN.

Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria.

Nature 1980;286:885-886

Kontoyiannis DP, Chamilos G, Lewis RE, Giralt S, Cortes J, Raad I, Manning JT, Han X.

Increased bone marrow iron stores is an independent risk factor for invasive aspergillosis in patients with high-risk hematological malignancies and recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants.

Cancer 2007;110:1303-1306

Maertens J, Demuyneck H, Verbeken EK, Zachée P, Verhoef GEG, Vandenberghe P, Boogaerts MA.

Mucormycosis in allogeneic bone marrow transplant recipients: report of five cases and review of the role of iron overload in the pathogenesis.

Bone Marrow Transplantation 1999;24:307-312

May PM, Williams DR.

The inorganic chemistry of iron metabolism. In A. Jacobs, M Worwood (Eds).

Iron in Biochemistry and Medicine 1980 Vol II pp. 1-28. Academic Press, London.

McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D et al.

A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation.

Mol Cell 2000;5:299-309

Miceli MH, Dong L, Graziutti ML, Thertulien R, Van Rhee F, Barlogie B, Anaissie EJ.

Iron overload is a major risk factor for severe infection after autologous stem cell transplantation: a study of 367 myeloma patients.

Bone Marrow Transplantation 2006;37:857-864

Miles AA, Khimji PL, Maskell J.

The variable response of bacteria to excess ferric iron in host tissues.

Journal of Medical Microbiology 1979;12:17-28

Morgan EH.

Transferrin, biochemistry, physiology and clinical significance.

Molecular Aspects of Medicine 1981;4:1-123

Neilands JB.

Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds.

Journal of Biological Chemistry 1995;270:26723-26726

Papanikolau G, Pantopoulos K.

Iron metabolism and toxicity.

Toxicology and Applied Pharmacology 2005;202:199-211

Payne SM, Finkelstein RA.

Patogénesis and immunology of experimental gonococcal infection: role of iron in virulence.

Infection and Immunity 1975;12:1313-1318

Pérez G, Vittori D, Pregi N, Garbossa G, Nesse A.

Homeostasis del hierro, mecanismos de absorción, captación celular y regulación.

Acta Bioquím Clín Latinoam 2005;39:301-314

Petersen KM, Parkinson AJ, Nobmann ED, Bulkow L, Yip R, Mokdad A.

Iron deficiency anemia among Alaska Natives may be due to fecal loss rather than inadequate intake.

J Nutr 1996;126:2774-2784

Pietrangelo A.

Hereditary Hemochromatosis –A new lood at an old disease.

NEJM 2004;350:2383-2397

Pré J.

La lipoperoxydation.

Pathol Biol 1991;39:716-736

Robins-Browne RM, Prpic.

Effects of iron and desferrioxamine on infections with *Yersinia enterocolitica*.

Infection and Immunity 1985;47:774-779

Robson KJ.

Hepcidin and its role in iron absorption.

Gut 2004;53:617-619

Rose Ch, Ernst O, Hecquet B, Maboudou P, Renom P, Noel MP, Yakoub-Agha I, Bauters F, Jouet JP.

Quantification by magnetic resonance imaging and liver consequences of post-transfusional iron overload alone in long-term survivors after allogeneic hematopoietic stem cell

transplantation.

Haematologica 2007;92:850-853

Sahlstedt L, Ebeling F, Bonsdorff L, Parkkinen J, Ruutu T.

Non-transferrin-bound iron during allogeneic stem cell transplantation.

British Journal of Haematology 2001;113:836-838

Schade AL, Caroline L.

Raw hen egg white and the role of iron in growth inhibition of *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*.

1944;100:14-15

Schade AL, Caroline L.

An iron binding component in human blood plasma.

Science 1946;104:340-341

Schroth MN, Hancock JG.

Disease –suppressive soil and root-colonizing bacteria.

Science 1982;216:1376-1381

Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N et al.

Identification of an intestinal heme transporter.

Cell 2005;122:789-801.

Sierra J.

Fundamento, tipos y principales indicaciones del TPH.

En Carreras E, Brunet S, Ortega JJ, Rovira M, Sierra J, Urbano-Ispizua A (eds) Manual de Trasplante Hemopoyético, 2ª edición. Barcelona: Antares; 2000. p. 9-11.

Strasser SI, Kowdley KV, Sale GE, McDonald GB.

Iron overload in bone marrow transplant patients.

Bone Marrow Transplantation 1998;22:167-173

Sturrock A, Alexander J, Lamb J, Craven CM, Kaplan J.

Characterization of a transferrin-independent uptake system for iron in HeLa cells.

J Biol Chem 1990;265:3139-3145

Sword CP.

Mechanism of pathogenesis in *Listeria monocytogenes* infection: I, influence of iron.

Journal of Bacteriology 1966;92:536-542

Tomás JF, Pinilla I, García-Buey ML, García A, Figuera A,

Gómez-García de Soria V, Moreno R, Fernández-Rañada JM.

Long-term liver dysfunction after allogeneic bone marrow transplantation: clinical features and course in 61 patients.

Bone Marrow Transplantation 2000;26:649-655

Urbano-Ispizua A.

Fuentes de Progenitores Hemopoyéticos.

En Carreras E, Brunet S, Ortega JJ, Rovira M, Sierra J, Urbano-Ispizua A (eds) Manual de Trasplante Hemopoyético, 2ª edición. Barcelona: Antares; 2000. p. 9-11.

Vulpe CD, Kuo YM, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J, Anderson GJ.

Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse.

Nat Genet 1999;21:195-9

Ward CG, Bullen JJ, Rogers HJ.

Iron and Infection: new developments and their implications. Journal of Trauma, Injury Infection and Critical Care 1996; 41:356-364

Wardman P, Candelas LP.

Fenton chemistry: an introduction.

Radiat Res 1996;145:523-531

Weinberg ED

Iron withholding; a defense against infection and neoplasia.

Physiological Reviews 1984;64:65-102

Weinberg ED.

Cellular regulation of iron assimilation.

Quarterly Review of Biology 1989;64:261-290

Weinberg ED, Weinberg GA.

The role of iron in infection.

Current Opinion in Infectious Diseases 1995;8:164-169

Wick M, Pinggera W, Lehmann P.

Iron metabolism, diagnosis and therapy of anemias.

3th ed. New York: Springer; 1996.

Williams P, Griffiths E.

Bacterial transferrin receptors –structure, function and contribution to virulence.

Medical Microbiology and Immunology 1992;181:301-322

Wooldridge KG, Williams PH.

Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria.

FEMS Microbiology Reviews 1993;12:325-348

Wright AC, Simpson LM, Oliver JD.

Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus*.

Infection and Immunity 1981;34:503-507

www.palomar.edu/oceanography/iron.htm

