

Conceptos actuales sobre fisiología y patología del hierro

García Rosolen N*, Eandi Eberle S*, Feliú Torres A*, y Musso AM**



REVISIÓN

*Hospital de Pediatría "Prof Dr Juan P Garrahan" y
**Hospital Militar Central "Cir My Dr Cosme Argerich"

Fecha de recepción: 17/06/10
Fecha de aprobación: 24/06/10

HEMATOLOGIA, Vol. 14 N° 2: 48-57
Mayo-Agosto, 2010

RESUMEN

En los últimos diez años los conocimientos sobre la fisiología del hierro han evolucionado considerablemente. De un modelo relativamente simple, en el que la absorción se realizaba por la vía del receptor de transferrina y el almacenamiento estaba basado en la ferritina, ha pasado a ser un proceso complejo y altamente regulado. Actualmente se sabe que, en este proceso se integran las funciones especializadas de algunos tipos de células y las acciones de múltiples proteínas genéticamente programadas. Todas las células del organismo requieren la presencia de hierro, en una forma u otra, para su normal funcionamiento. Sin embargo, cuatro poblaciones celulares se destacan en este contexto, son los enterocitos, los macrófagos, los hepatocitos y los eritroblastos. La identificación de proteínas como HFE, RTf-2, hemojuvelina, hepcidina, ferroportina, hefaestina, matriptasa-2, etc., unas actuando como transportadores, otras con actividad oxidasa o reductasa, todas ellas participando en la delicada regulación del metabolismo del hierro, son evidencia directa del conocimiento adquirido en los últimos años. Estos fascinantes estudios han permitido conocer mejor la fisiopatología de la deficiencia y la sobrecarga de hierro, y seguramente permitirán mejorar su diagnóstico y tratamiento.

Palabras clave: Hierro, Fisiología, Anemia, Hemocromatosis

INTRODUCCIÓN

El hierro tiene una función esencial en el metabolismo de los mamíferos, por su capacidad para aceptar y ceder electrones, como componente fundamental del grupo hemo de la hemoglobina, la mioglobina, los

citocromos y otras enzimas. Por otro lado, el hierro reacciona con el oxígeno formando radicales hidroxilo y anión superóxido, que causan daño oxidativo al interactuar con moléculas biológicas tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos^{1,2}.

El organismo debe mantener la homeostasis del hierro para asegurar las actividades biológicas normales, sin que se produzcan efectos nocivos. El control de los niveles sistémicos de hierro se logra mediante la regulación de su absorción y almacenamiento. No se conocen mecanismos que regulen su excreción, pero se sabe que hay una pequeña pérdida fisiológica¹.

En un adulto normal la cantidad total de hierro es 4 a 5 g. Aproximadamente 2,5 g se encuentran en la hemoglobina. El hierro de los hematíes es reciclado por los macrófagos tisulares cuando se produce la eritrosis o apoptosis de los eritrocitos. En este proceso se recuperan entre 25 y 30 mg de hierro por día, cantidad necesaria para la eritropoyesis diaria³. Por otra parte, el hierro eliminado principalmente por exfoliación de las células intestinales y las pérdidas menstruales, es compensado por la absorción intestinal. Ésta provee 1-2 mg por día, cantidad que puede aumentar en respuesta a deficiencia de hierro, hipoxia o incremento de la eritropoyesis⁴. El aumento de la absorción intestinal de hierro es muy importante para mantener el balance del mismo en el organismo¹.

El hierro en solución puede encontrarse en dos estados de oxidación, ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}),

y es muy poco soluble a pH fisiológico. Por este motivo, los organismos vivos se valen de proteínas para transportarlo y almacenarlo de manera que no sea tóxico³.

ABSORCION INTESTINAL

La absorción de hierro se define como el pasaje desde la luz intestinal hacia la circulación a través de los enterocitos. Se realiza principalmente en el duodeno y el yeyuno proximal, cuyas mucosas poseen microvellosidades que maximizan la superficie absorbente⁵. Allí también existen **integrinas** que facilitan la unión y la posterior transferencia del metal al interior de las células².

El hierro de los alimentos se encuentra en forma hemínica (10%) y no hemínica o iónica (90%). El mecanismo de absorción del hierro hemínico permanece aun poco conocido.⁵ Se propuso que la proteína de membrana HCP1 (*heme carrier protein-1*)⁶ mediaba su absorción, pero luego se demostró que la función principal de esta proteína es transportar folato⁷. Se sabe que el complejo hierro-protoporfirina ingresa al enterocito en forma directa, y en su interior el hemo es clivado enzimáticamente por la **hemoxigenasa** (HO1). Luego, el hierro así liberado ingresa a una vía común con el hierro no hemínico. El descubrimiento de proteínas exportadoras del grupo hemo, como **FLVCR** (*feline leukemia virus subgroup C receptor*), plantea la posibilidad del pasaje de hemo intacto del enterocito hacia el plasma⁸.

Por otro lado, el mecanismo de absorción del hierro iónico ha sido bien estudiado. Se sabe que su pasaje a través de las membranas celulares requiere cambios

en el estado de oxidación, y que los mismos son catalizados por diversas enzimas fundamentales para su transporte al interior del organismo¹ (Fig. 1).

Transporte a través de la membrana apical de los enterocitos

El hierro de la luz intestinal debe encontrarse en estado ferroso (Fe²⁺) para poder atravesar la membrana apical del epitelio de la mucosa intestinal. Para ello, el ion férrico (Fe³⁺) de los alimentos es reducido por una enzima que se encuentra en dicha membrana, llamada **citocromo B duodenal** (**DCYTB = duodenal cytochrome B**). Esta enzima utiliza los electrones del NADP⁺ citosólico para dicha reacción¹.

El hierro reducido es transportado al interior del enterocito por la proteína conocida como **transportador de metales divalentes** (**DMT1 = divalent metal transporter-1**). Además de Fe²⁺, esta proteína puede transportar zinc, manganeso, cobalto, cadmio, cobre, níquel y plomo⁵. DMT1, conocida también como Nrap1 (*natural resistance associated macrophage protein-1*), es una glicoproteína altamente conservada con 12 dominios transmembrana. La síntesis de DMT1 y de DCYTB es fuertemente inducida por la deficiencia de hierro, a través de los **elementos respondedores al hierro** (**IRE = iron responsive element**) de sus respectivos ARNm^{3,9,10}. El **factor inducible por la hipoxia** (**HIF = hypoxia inducible factor**), por la vía de **HIF-2α**, activa la expresión de DCYTB y DMT1 en el duodeno para aumentar la absorción de hierro¹⁰.

DMT1 es el único importador de hierro conocido. Se expresa en la membrana exterior de los enterocitos y en la membrana de los endosomas de todas las cé-

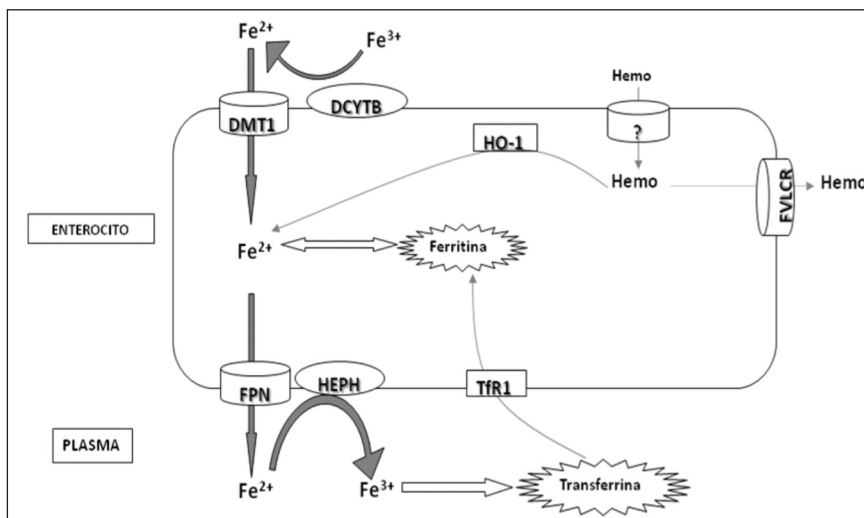


Fig. 1. Vías de absorción de hierro por el enterocito

lulas¹. Actúa por un mecanismo acoplado a protones, que son provistos por el ácido gástrico que llega a la primera porción del duodeno donde DMT1 se expresa en forma más activa. El tratamiento con antiácidos o con bloqueantes de la secreción ácida gástrica interfiere con la absorción de hierro, ya que disminuye la disponibilidad de protones⁵.

Hasta el 2009 se describieron tres casos con mutaciones del DMT1 en humanos. Todos presentaban anemia microcítica hipocrómica debida a una disminución en la utilización del hierro por los precursores eritroides, saturación de transferrina elevada, ferritina sérica levemente aumentada, hepcidina urinaria normal o baja, y sobrecarga de hierro en hígado. Este cuadro se había observado en modelos animales con mutación del gen DMT1 pero, a diferencia de los humanos, sin aumento del hierro hepático¹¹.

Una vez en el interior del enterocito, el hierro se une a la proteína citosólica duodenal **mobilferrina**². A partir de allí puede ser exportado al plasma donde es captado por la **transferrina (Tf)**, que es su proteína de transporte, o ser incorporado a la **ferritina** intracelular para su almacenamiento⁴.

Transporte del hierro no hemínico a través de la membrana basolateral de los enterocitos

La salida del hierro al compartimiento extracelular se realiza por medio de la **ferroportina (FPN)**, única proteína exportadora conocida. Se encuentra en todas las células que deben exportar hierro, incluyendo la mucosa duodenal, los macrófagos esplénicos y hepáticos, y las células placentarias^{1,4}.

Se han publicado casos de pacientes con anemia moderada por mutaciones en el gen de la FPN con pérdida de su función¹¹.

La FPN fue descrita en el año 2000, tiene una masa de 67 kD, 12 dominios transmembrana y parece funcionar como un dímero. Existe una importante relación entre la FPN y una familia de oxidasas que convierten el Fe²⁺ en Fe³⁺, para que éste pueda unirse a la transferrina. Estas **ferroxidasas** contienen cobre en su estructura y usan oxígeno como aceptor de electrones para oxidar el hierro¹. En los enterocitos duodenales la **hefaestina**, homóloga de la ceruloplasmina, cumple esta función unida a la membrana basolateral con un anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI). La **ceruloplasmina** plasmática tiene importancia como ferroxidasa en relación con la exportación de hierro de macrófagos y hepatocitos^{5,11}.

El gradiente químico generado por la oxidación del hierro constituye la fuerza que impulsa el egreso del hierro mediado por la ferroportina. En ausencia de hefaestina, el hierro no puede ser exportado y permanece en la mucosa intestinal¹. Ratones mutantes

en el gen de la hefaestina, ubicado en el cromosoma X, presentan anemia moderada a severa, microcítica e hipocrómica, ligada al sexo¹¹.

REGULACIÓN POR PARTE DE LA HEPCIDINA

No existe un mecanismo por el cual los organismos puedan eliminar el hierro en exceso, por lo tanto la sobrecarga del mismo sólo puede ser evitada mediante una delicada regulación de la absorción intestinal y del reciclaje que realizan los macrófagos³. La **hepcidina** es una molécula reguladora central de la homeostasis sistémica del hierro. Fue aislada y caracterizada en el 2001, por dos grupos de investigadores simultáneamente^{12,13,14}. Está codificada por el gen **HAMP**, ubicado en el cromosoma 19q13. Perteneció a la familia de las defensinas y su nombre se debe a *hep* por hepatocito y *cidina* por su actividad antimicrobiana. La importancia de esta proteína se puso en evidencia en modelos de ratones transgénicos y en patología humana con fenotipos severos de sobrecarga de hierro, por delecciones del gen HAMP que producen tanto deficiencia como exceso de función¹.

La hepcidina es una hormona sintetizada principal pero no exclusivamente en el hígado. Un pre-peptido de 84 aminoácidos sufre un clivaje postraduccional dando una molécula activa de 25 aminoácidos con 8 residuos cisteína, importantes para la formación de los puentes disulfuro. Circula en el plasma unida a alfa-2-macroglobulina y se elimina con la orina¹⁴.

Se sabe que la hepcidina produce una disminución del hierro plasmático porque inhibe su liberación por las células, especialmente enterocitos y macrófagos. Cuando la hepcidina se une a la ferroportina hace que ésta sea fosforilada, internalizada, ubiquitinizada y posteriormente degradada en los lisosomas. Así se produce la remoción del exportador del hierro, y éste debe permanecer en la célula almacenado como ferritina¹.

La expresión del gen de la hepcidina aumenta en la inflamación y en la sobrecarga de hierro, y disminuye en la anemia, en deficiencia de hierro y cuando aumenta la eritropoyesis. Así, la hepcidina se comporta como un "ferrostatato" en el organismo³. La regulación de su expresión parece realizarse a nivel de la transcripción del gen HAMP.

Regulación positiva de la expresión de hepcidina

Contenido de hierro corporal

La sobrecarga de hierro induce un aumento en la síntesis de hepcidina. El mecanismo que regula la expresión génica de la hepcidina no está comple-

tamente elucidado, pero se sabe que tres proteínas individualmente o asociadas entre sí participan en la regulación. Son la **hemojuvelina (HJV)**, el **receptor de transferrina-2 (RTf2)** y la **proteína de la hemocromatosis hereditaria (HFE)**.

Estas proteínas parecen depender de la vía de señalización que involucra al receptor de las **proteínas morfogénicas óseas (BMPs = bone morphogenic proteins)** y **SMAD4**, una proteína que modula la actividad de ligandos del TGF-β (*transforming growth factor beta*). En este mecanismo la proteína **BMP6**, cuya expresión génica está directamente regulada por la cantidad de hierro existente, activa a su receptor **BMPR** y así por la vía de señalización de **SMAD4** se activa la transcripción de hepcidina^{3, 5, 15}.

Se sabe que la **HJV** se une a la membrana celular con un anclaje GPI y funciona como co-receptor de **BMPR**, aumentando la eficiencia de interacción de **BMP** con su receptor para estimular la expresión de hepcidina. La forma soluble de la **HJV**, por el contrario, actúa como un antagonista del **BMPR**¹⁶. Se han comunicado casos de Hemocromatosis Hereditaria tipo 2 (juvenil) por mutaciones en el gen de **HJV**, que conducen a la falta de expresión de hepcidina tal como sucede con la mutación del gen **HAMP**.

Por acción de la serinoproteasa **matriptasa-2** (cuyo gen es **TMPRSS6**), la **HJV** se libera de la membrana celular y pasa a ser soluble perdiendo su actividad

de co-receptor de **BMPR**. Éste puede seguir actuando en menor medida en la expresión del gen **HAMP**¹⁷. En condiciones normales, matriptasa-2 regula negativamente la síntesis de hepcidina. En pacientes con mutaciones en **TMPRSS6** se observó anemia ferropénica refractaria al hierro (**IRIDA= iron-refractory iron deficiency anemia**), con microcitosis e hipocromía pero con niveles elevados de hepcidina en orina^{18, 19, 20, 37}. Esta anemia no responde al tratamiento con hierro oral y tampoco en forma completa a la administración de hierro parenteral. Los niveles elevados de hepcidina explican el defecto en la absorción de hierro en estos pacientes¹¹ (Fig. 2).

Recientemente se identificaron la **neogenina** y la **furina**, que también participan en el clivaje de **HJV**¹⁰. Aún no se sabe si la interacción entre **HJV**, matriptasa-2 y neogenina, depende de la cantidad de hierro existente o de otras señales¹⁶.

Las proteínas **HFE** y **RTf2**, además de **HJV/BMP**, son necesarias para la regulación de la síntesis de hepcidina.

HFE interacciona normalmente con el **receptor de transferrina-1 (RTf1)**, cuando la **Tf** circulante no está saturada con hierro. Cuando la **Tf** se encuentra saturada (holoTf), ésta aumenta su afinidad por **RTf1** y se une al mismo desplazando a **HFE**. Entonces, **HFE** interacciona con **RTf2** y el complejo así formado activa la señalización vía **HJV/BMP**.

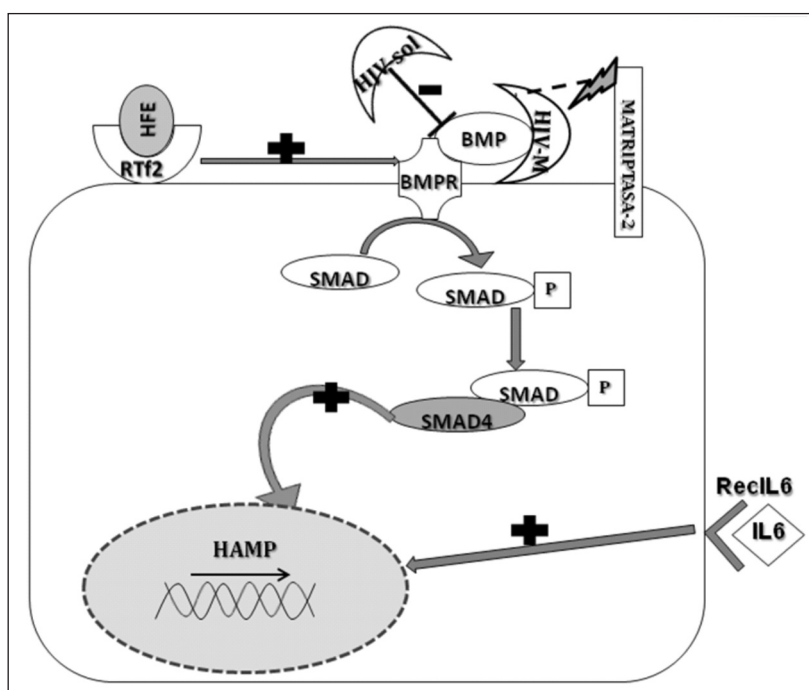


Fig. 2. Vías de estimulación de la síntesis de hepcidina

Si los genes HFE o RTf2 están mutados, se desregula la expresión de hepcidina y se produce sobrecarga de hierro²¹. Mutaciones en el gen que codifica HFE llevan a la Hemocromatosis Hereditaria tipo 1, siendo la más común una mutación puntual que impide el correcto plegamiento de la proteína¹⁰.

Inflamación

Otra forma de activación de la transcripción de hepcidina ocurre en la inflamación, con la consiguiente disminución de la absorción intestinal de hierro y retención del mismo en los macrófagos. La **Interleukina 6 (IL6)**, por la vía de STAT3, es la responsable de activar al promotor del gen HAMP⁸. Las características de la anemia de la inflamación, con disminución de la absorción intestinal de hierro, ferremia baja y aumento de hierro en los macrófagos, son consecuencia del aumento en la producción de hepcidina³. La hipoferremia sería un componente de la inmunidad innata para limitar la disponibilidad de hierro a los microorganismos^{8, 16}. Por otro lado, se sabe que los pacientes con enfermedad renal en diálisis cursan un proceso inflamatorio crónico, con altos niveles de citoquinas que estimulan la expresión de hepcidina²².

Regulación negativa de la síntesis de hepcidina

Actividad eritropoyética

El aumento de la actividad eritropoyética es un potente inhibidor de la síntesis de hepcidina, sin embargo no es la eritropoyetina la que ejerce directamente dicho efecto.

En las anemias con eritropoyesis ineficaz, son las proteínas **GDF15** (*growth differentiation factor 15*) y **TWSG1** (*twisted gastrulation*) las propuestas como responsables de la supresión de síntesis de hepcidina¹⁴. GDF15, miembro de la familia de TGF- β , es secretada por los eritroblastos en sus estadios finales de maduración¹⁰. Se encuentra sobreexpresada cuando hay expansión de la masa de precursores eritroides. Al unirse a su receptor activa una cascada de señales que bloquean la transcripción del gen HAMP¹¹.

Contrariamente a GDF15, TWSG1 es una proteína sintetizada por eritroblastos inmaduros en los estadios tempranos de la eritropoyesis¹⁰. Se une a BMPR e interfiere con la activación de esta vía para la síntesis de hepcidina¹⁴.

Hipoxia

HIF tiene un papel preponderante en la absorción intestinal de hierro. En la ferropenia, HIF activa la

expresión de DCYTB y DMT1 en el duodeno para aumentar la absorción de hierro. En condiciones normales, la presencia de suficiente cantidad de oxígeno hace que propilhidroxilasas dependientes de hierro modifiquen el HIF y éste interactúe con el factor de von Hippel-Lindau. Esta interacción provoca la ubiquitinación de HIF y precipita su degradación en el proteasoma.

En condiciones de hipoxia HIF no es degradado porque las propilhidroxilasas están inhibidas, entonces se trasloca al núcleo del hepatocito y se une al promotor de la hepcidina (HAMP) para suprimir su expresión. De este modo también aumenta la absorción y la movilización de hierro, independientemente del estado de las reservas en el organismo¹⁰.

Es posible que el efecto principal de la hipoxia en la homeostasis del hierro sea aumentar la producción de eritropoyetina, con el consiguiente estímulo para el desarrollo de la progenie eritroide e inhibición de la síntesis de hepcidina por los factores GDF15 y TWSG1 sintetizados por los eritroblastos¹⁶.

HIF, por la vía de HIF-2 α , activa la expresión del ARNm de eritropoyetina tanto en hepatocitos como en fibroblastos intersticiales de la corteza renal^{35, 36}.

ERIPTOSIS Y RECICLAJE

El reciclaje del hierro hemínico, de los glóbulos rojos senescentes, constituye la fuente principal de hierro para la eritropoyesis. Los macrófagos hepáticos y esplénicos son los encargados de esta tarea¹⁰.

Durante su vida los glóbulos rojos acumulan cambios bioquímicos en su superficie, tales como peroxidación de lipoproteínas de membrana, pérdida de residuos de ácido siálico y formación de neoantígenos de senescencia, como la Banda 3 modificada. La eriptosis se caracteriza por contracción de la membrana del eritrocito y externalización de fosfatidilserina, que es reconocida por su receptor específico en la membrana de los macrófagos (CD36). Los eritrocitos fagocitados se fusionan con vesículas endosómicas y con el retículo endoplásmico, donde se encuentra un complejo enzimático formado por NADPH-citocromo C reductasa, HO1 y biliverdin reductasa^{3, 11}.

El hierro liberado por el catabolismo del hemo es exportado del macrófago por la FPN. El grupo hemo puede ser transferido directamente a la circulación por FLVCR, un exportador específico del mismo que también desempeña un papel importante en la homeostasis del hierro en los eritrocitos inmaduros y en los hepatocitos. El grupo hemo que abandona las células es fijado por la **hemopexina** y transportado al hígado para su catabolismo¹⁰.

La FPN exporta el hierro de los macrófagos y hepatocitos estabilizada en sus membranas por la

ceruloplasmina (ferroxidasa multicobre), que cataliza la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} , cambio necesario para la exportación. Una forma de ceruloplasmina con anclaje a membrana de tipo GPI se expresa en células del sistema nervioso²³. La deficiencia de cobre limita la actividad de la ceruloplasmina como ferroxidasa. La *aceruloplasminemia* es una rara enfermedad hereditaria, autosómica recesiva, con más de 25 mutaciones descritas que provocan sobrecarga de hierro en hígado y otros órganos, diabetes, degeneración de la retina, distonía, ataxia y demencia. Cursa con anemia microcítica, ferremia disminuida y ferritina elevada¹¹.

TRANSFERRINA Y RECEPTORES DE TRANSFERRINA

El hierro que es exportado de las células (enterocitos, macrófagos, hepatocitos, etc.) por la FPN se une a la Tf plasmática, una glicoproteína β_1 globulina de 80 kDa codificada en el cromosoma 3. Es sintetizada en el retículo endoplásmico de las células parenquimatosas del hígado, y en menor medida en SNC, células de Sertoli y macrófagos del tejido linfóide. Su vida media es de 8 días¹. Existen otros dos tipos de Tf, la lactoferrina y la ovoferrina, que en las infecciones fijan el hierro e impiden que esté disponible para los agentes microbianos².

La función principal de la Tf es transportar hierro férrico (Fe^{3+}), al que se une en forma fuerte pero reversible. La unión es favorecida por un pH alcalino que se logra con la presencia de un anión, carbonato o bicarbonato. La Tf tiene la capacidad de unir dos átomos de Fe^{3+} , y esto provoca un cambio conformacional en la proteína. Normalmente, la saturación con hierro de la Tf circulante es un tercio de su capacidad total, pero no en forma homogénea. La proteína que permanece insaturada (apoTf 70%) actúa como *buffer* ante la posibilidad de que hierro absorbido o liberado en cantidad quedase en estado libre y resultase tóxico para el organismo¹.

Cuando la capacidad de saturación de la Tf es superada, puede aparecer en el plasma hierro no unido a Tf (NTBI = *non-transferrin-bound serum iron*)². Esta fracción de hierro es biológicamente tóxica y dentro de la misma se encuentra el hierro plasmático lábil (LPI = *labile plasma iron*), que es el de mayor toxicidad. NTBI penetra en las células independientemente del RTf, así lo hace en hígado, corazón y otros órganos por difusión pasiva o por un transportador no conocido aun²⁴. El hierro libre tiene una actividad redox ilimitada, capaz de generar especies reactivas del oxígeno en una cantidad tal que supere la capacidad del organismo para procesarlo. Estos radicales libres, como Hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), atacan macromoléculas

y promueven la peroxidación de lípidos de membrana. También las estructuras intracelulares son susceptibles a la peroxidación dependiente de hierro. En las células con sobrecarga de este metal los lisosomas se vuelven frágiles y pueden liberar su contenido de proteasas, causando aún mayor daño y en última instancia llevando a la muerte celular. Este proceso conduce al severo daño observado en hígado, corazón, articulaciones, páncreas, gónadas, etc. de los pacientes con desórdenes por sobrecarga de hierro²⁵.

Una forma de medir la Tf del plasma es cuantificar el hierro que se une a ella. La suma de la ferremia y la capacidad de transporte de la Tf insaturada (UIBC = *unsaturated iron-binding capacity*) es la capacidad total de transporte de hierro de la Tf (TIBC = *total iron-binding capacity*), equivalente a la concentración de esta proteína en el plasma. La TIBC aumenta en la deficiencia de hierro y en el embarazo, y disminuye en los procesos inflamatorios e infecciosos, enfermedades malignas y renales²⁶.

El complejo Fe/Tf puede unirse a dos tipos de receptores, RTf1 y RTf2.

RTf1 es un homodímero, que consta de dos subunidades transmembrana idénticas unidas por puentes disulfuro¹. Se expresa en gran cantidad en todas las células en división, en linfocitos activados y en los precursores eritroides con mayor demanda de hierro¹. Se une selectivamente a la Tf diférrica para internalizarla en la célula (endocitosis mediada por receptor)⁵.

RTf2 es un homólogo de RTf1, cuya expresión está restringida a hepatocitos, células duodenales y eritroides, lo que sugiere un rol más especializado en el metabolismo del hierro^{8,16}. Se une al complejo Fe/Tf con menor afinidad que el RTf1, y su papel principal es como molécula de señalización¹. Cuando la Tf circulante se encuentra saturada, RTf2 interactúa con la proteína HFE para que aumente la síntesis de hepcidina.

El complejo **Fe/Tf-RTf1** es rápidamente internalizado por endocitosis en una vesícula cubierta por clatrina. En los endosomas el complejo es acidificado por una bomba protónica ATP dependiente, y la disminución del pH produce un cambio conformacional tanto en el complejo Fe/Tf como en su receptor. De este modo el Fe^{3+} es liberado en el interior del endosoma, donde es reducido a Fe^{2+} por una ferrireductasa (**STEAP3** = *6-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3*) y queda disponible para ser exportado al citosol por DMT1 presente en la membrana endosomal¹.

STEAP3 se expresa con intensidad en tejido hematopoyético, colocaliza en los endosomas con RTf1 y con DMT1, y su deficiencia se estudió en modelos animales que presentaron anemia microcítica hipocrómica.

La apoTf permanece unida al RTf1 en el interior del endosoma a pH ácido, y el complejo es reciclado a la superficie celular. En el exterior, el pH neutro permite la disociación y posterior liberación de la apoTf al plasma. El ciclo entero de Tf-RTf se completa en pocos minutos y se repite 100 a 200 veces durante la vida media de la Tf en circulación¹.

DESTINO DEL HIERRO MITOCONDRIAL: BIOSÍNTESIS DE HEMO Y DE COMPLEJOS Fe-S

En las células eritroides, la mayor parte del hierro exportado de los endosomas se destina a la mitocondria. La **mitoferrina** es la responsable de transportar el hierro a través de la membrana mitocondrial interna, para que sea utilizado en la síntesis del **grupo hemo** y de los **complejos hierro-sulfuro (ISC = iron sulfur clusters)**, así como formar parte de la **ferritina mitocondrial**.

La síntesis del hemo se realiza con la participación de ocho enzimas, algunas localizadas en la mitocondria y otras en el citosol. El primer paso es catalizado por la 5-aminolevulínico-sintetasa (ALAS), que produce la condensación de glicina y succinilCoA para formar ácido 5-aminolevulínico (ALA). Esta enzima está codificada por dos genes diferentes: ALAS1 en el cromosoma 3, y ALAS2 en el cromosoma X con expresión exclusivamente eritroide. La regulación de estos genes es esencial para el control de la síntesis del hemo, que a su vez ejerce una regulación negativa sobre ALAS1 en el hígado inhibiendo su transcripción, traducción y localización mitocondrial. En cambio, ALAS2 está regulado en las células eritroides por la cantidad de hierro presente.³ Una vez sintetizado, ALA es transportado al citosol donde luego de cuatro reacciones enzimáticas más se forma **protoporfirinógeno**. Éste es transformado en la mitocondria en **Protoporfirina IX (PPIX)**. La deficiencia de cualquiera de las enzimas que participan en este proceso, excepto ALAS, es causa de porfiria por toxicidad directa de las porfirinas²⁷.

La **ferroquelatasa** es la enzima involucrada en la última reacción de la biosíntesis del grupo hemo. Se localiza en la membrana mitocondrial interna y cataliza la inserción de Fe²⁺ en el anillo de PPIX. En la deficiencia de hierro esta enzima incorpora zinc a PPIX causando la acumulación de ZnPPIX en los eritroblastos. Mutaciones en los genes de ferroquelatasa o de mitoferrina causan la acumulación de PPIX libre y el desarrollo de Protoporfiria eritropoyética^{3,5}.

Una vez sintetizado, el hemo se exporta por medio de proteínas de la familia **ABC (ATP-Binding Cassette)**, para unirse en el citosol a las globinas y citocromos.

Otro destino del hierro en la mitocondria es el ensamblaje de los **ISC**. Estos complejos poseen una estructura compuesta por cationes (Fe²⁺ o Fe³⁺) y aniones (S²⁻), y tienen como función ser cofactores de enzimas, de proteínas transportadoras de electrones en la mitocondria, citosol y núcleo, y de componentes de la cadena respiratoria y fotosintética. También son sensores de la cantidad de hierro corporal³. Su estructura es relativamente simple pero su ensamblaje es complejo y altamente regulado²⁸. Se realiza en la mitocondria y en el citosol por maquinarias diferentes, cuyas deficiencias pueden ser causa de anemia. La **glutaredoxina** es una enzima dadora de electrones, que participa en la biogénesis de ISC cuando aumenta la cantidad de hierro en las células^{3,27}.

Mutaciones en los genes ALAS2, ABCB7, o GRLX5 (presentes en el cromosoma X) son causa de anemia sideroblastica hereditaria por depósito intramitocondrial de hierro²⁷.

En la mitocondria se encuentra un tipo de **ferritina** cuyo papel no está del todo aclarado. Se cree que es una forma de protección contra un eventual daño oxidativo mediado por el hierro³.

HIERRO DE RESERVA

Los macrófagos son células capaces de almacenar el hierro proveniente de eritrocitos senescentes, de células apoptóticas, del plasma y también de bacterias. El hierro se almacena en el citosol de los macrófagos en forma de **ferritina**, y la degradación de ésta en los lisosomas da origen a la **hemosiderina**⁸.

La ferritina es un heteropolímero proteico, con un peso molecular de 450 kDa, sintetizado por eritroblastos, epitelio de la mucosa intestinal, macrófagos y hepatocitos. Se encuentra dentro de las células y también en el plasma. La apoferritina se compone de 24 subunidades, siendo éstas de tipo H y L, en cantidades relativas que dependen de cada tejido. En corazón y riñones es rica en subunidades H, en cambio predominan las subunidades L en hígado y en bazo. Estas relaciones pueden modificarse en la inflamación u otras patologías. Sólo la cadena H tiene actividad de ferroxidasa¹. Las subunidades se ensamblan para formar una esfera, con una cavidad central donde puede almacenar hasta 4500 átomos de hierro cristalino en forma oxidada (Fe³⁺). La ferritina permite que el hierro esté disponible para los procesos celulares, y al mismo tiempo mantiene protegidos a los lípidos, ácidos nucleicos y proteínas de los efectos tóxicos de este metal^{1,29}. La concentración plasmática de ferritina es un parámetro de referencia útil para estimar la cantidad del hierro de reserva. Por tratarse de un reactante de fase aguda, su concentración aumenta en los procesos inflamatorios y tumorales.

También se observa su aumento en hepatocitopatías, insuficiencia renal e hipertiroidismo. En cambio, las únicas condiciones que pueden acompañarse de un descenso en la concentración de ferritina en plasma, además de la deficiencia de hierro, son el hipotiroidismo y la deficiencia de ascorbato (vitamina C)³⁰.

REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS INTRACELULAR DEL HIERRO

La homeostasis intracelular del hierro se mantiene, al menos en parte, por mecanismos regulatorios postranscripcionales, a través de los elementos respondedores al hierro (IREs = *iron responsive elements*) y las proteínas reguladoras del hierro (IRPs = *iron regulatory proteins*).

Los IREs son secuencias de nucleótidos constituidas por 28 bases que forman una horquilla o "loop", que les permite interactuar con las IRPs. Están situados en regiones no codificantes del ARNm (UTR 5' o 3') y según su ubicación será el efecto ejercido sobre el mismo. Los IREs 5' controlan el inicio de la traducción, mientras que los IRE 3' modulan la estabilidad del ARNm. Las IRPs son moléculas que se unen al ARNm y actúan como sensores del contenido celular de hierro²⁷. Se conocen dos tipos de IRPs, con secuencias homólogas pero diferentes propiedades (Fig. 3).

La IRP1 es bifuncional y puede actuar como aconitasa o unirse a secuencias IRE, según el número de átomos de hierro que posea en el ISC de su sitio activo. Así, la IRP1 [4Fe-4S] tiene actividad aconitasa; mientras que en condiciones de baja disponibilidad

de hierro es la IRP1 [3Fe-4S] la que se unirá con alta afinidad a las secuencias IRE.

Del mismo modo, IRP2 se une con alta afinidad a los IRE en condiciones de baja disponibilidad de hierro. IRP2 no posee ISC en su estructura, pero tiene una secuencia rica en cisteína en su región N-terminal. Esta última es responsable de la degradación de IRP2, vía ubiquitina/proteasoma, cuando la cantidad de hierro dentro de la célula es alta²⁷.

En la deficiencia de hierro, IRP1 e IRP2 se unen al IRE en 3'UTR del ARNm de DMT1 y de RTf1, y al IRE en 5'UTR del ARNm de ferritina, ferroportina y ALAS2. La unión en 3' previene la degradación del ARNm, mientras que la unión en 5' bloquea la traducción del mismo²⁷.

En consecuencia, como respuesta a la deficiencia de hierro se activa la expresión de DMT1 y RTf1 para favorecer la absorción y transporte, y una menor expresión de ferritina, ferroportina y ALAS2 para favorecer la disponibilidad intracelular por sobre el almacenamiento²⁷.

Cuando hay abundante hierro en la célula, IRP1 tiene su ISC saturado y no puede unirse al IRE, e IRP2 es señalizada para su degradación en el proteasoma. De este modo se inactiva la unión de ambas IRPs a los IREs y se logra un aumento en la síntesis de ferritina para el almacenamiento y la rápida degradación de RTf1²⁷.

El grupo hemo también participa en la regulación de la homeostasis del hierro intracelular. Puede influenciar por sí mismo la expresión de genes a nivel de transcripción, procesamiento del ARN, traducción o modificaciones postraduccionales. Es

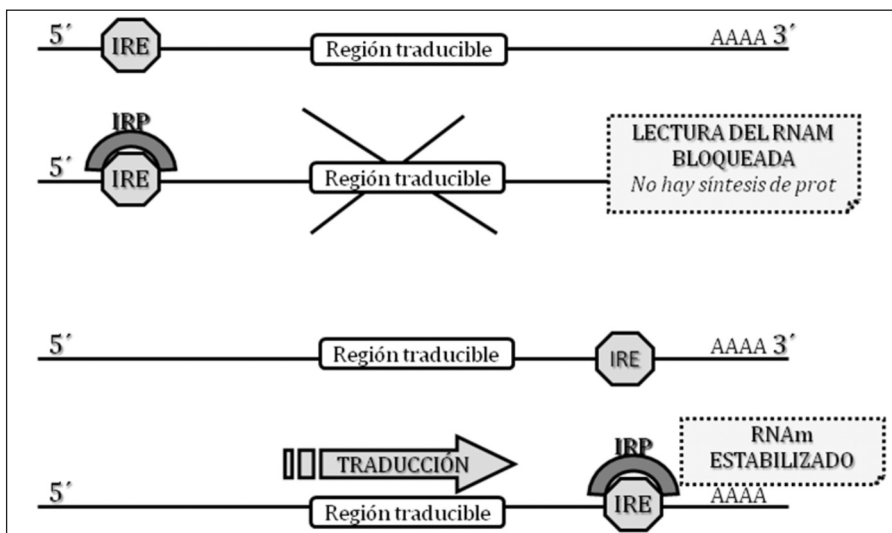


Fig. 3. Modulación por IRE-IRP

un potente inductor de la HO1, enzima que cataliza la degradación de dicho grupo prostético, y que a su vez tiene funciones citoprotectoras y antiinflamatorias. La deficiencia de grupos hemo reprime la traducción de las cadenas de globina, cuyo desbalance llevaría a un exceso y precipitación de estas últimas. La presencia de hemo induce la ubiquitinización de IRP2, para que sea degradada en el proteasoma, y al no poder unirse con el IRE en 3'UTR del ARNm de RTf1 se reduce la absorción intestinal de hierro¹¹.

EXCRECIÓN Y PÉRDIDA DE HIERRO

En condiciones fisiológicas se excretan 1-2 mg de hierro por día. Las pérdidas normales se producen por descamación de las células epiteliales del tubo digestivo (principalmente) y de la piel, el sudor y la orina, la menstruación y la lactancia. La pérdida de sangre en una **menstruación** normal es aproximadamente 30 ml, pero puede llegar a 118 ml en algunas mujeres³¹. En 100 ml de sangre hay 40-50 mg de hierro, y la pérdida menstrual excesiva suele ser causa de ferropenia en mujeres jóvenes que no tienen un aporte alimentario de hierro adecuado. Durante el **embarazo** se produce un considerable aumento del requerimiento de hierro. En el segundo y tercer trimestres de un embarazo normal la demanda de hierro asciende a 5 mg por día³¹. Las alteraciones en el **aporte alimentario** o en la **absorción intestinal**, como causa de deficiencia de hierro, tienen especial importancia en la infancia y en las mujeres embarazadas. En los adultos la causa más frecuente de ferropenia es la pérdida crónica de sangre. Las **repetidas extracciones de sangre** para análisis deben ser tenidas en cuenta como causa de ferropenia, especialmente en los niños. La pérdida de sangre al exterior no suele pasar desapercibida, pero en algunas circunstancias no se hace evidente y es necesario investigar la presencia de **sangre oculta en heces**. La **hemosiderinuria**, secundaria a hemólisis intravascular crónica (ej. hemoglobinuria paroxística nocturna), también debe ser investigada en el laboratorio. En algunas condiciones patológicas, el complejo **Tf/Fe** se pierde con la orina por defectos en la reabsorción tubular de proteínas del filtrado glomerular. Los síndromes proteinúricos son consecuencia de la deficiencia funcional de **cubilina**, **megalina** o **CIC-5**. La **cubilina** y la **megalina** son receptores de proteínas, ubicados en el túbulo proximal renal para la reabsorción de nutrientes filtrados por el glomérulo. **CIC-5** es un canal de iones cloruro necesario para la acidificación de las vesículas endocíticas y la liberación del hierro de la **Tf**¹⁰.

PATOLOGÍA RELACIONADA CON PROTEÍNAS QUE ACTÚAN EN EL METABOLISMO DEL HIERRO

Sobrecarga de hierro

Las *Hemocromatosis Hereditarias* son un grupo heterogéneo de desórdenes, que se han reconocido en los últimos años^{32, 33}. Se enumeran las entidades descritas y las mutaciones correspondientes:

- *Tipo 1*, gen HFE en el cromosoma 6p21 (frecuente en Caucásicos);
- *Tipo 2 A*, gen de la HVJ en 1q21;
- *Tipo 2 B*, gen HAMP de la hepcidina en 19q13;
- *Tipo 3*, gen del RTf2 en 7q22;
- *Tipo 4 A y B*, gen de la ferroportina en 2q32;
- *Tipo 5*, gen de la ceruloplasmina en 3q25.

En estos desórdenes la sobrecarga de hierro se puede desarrollar por *falla de hepcidina* o por *falla de ferroportina*³⁴.

La *falla de hepcidina* obedece a mutaciones en el gen HAMP o en genes de proteínas que regulan negativamente la expresión de HAMP; como HJV, HFE y RTf2. La deficiencia de hepcidina conduce a un aumento en la actividad de FPN. Lo mismo puede observarse si la mutación se produce en el gen de la FPN y hace que ésta no responda a la hepcidina^{32, 34}. La actividad desregulada de la FPN provoca aumento de la absorción intestinal de hierro y mayor liberación del mismo por los macrófagos, con aparición de NTBI en la circulación que es incorporado por hígado, corazón, páncreas y otros órganos.

La *falla de ferroportina* puede observarse por una deficiencia funcional de esta proteína o por aceruloplasminemia hereditaria. En el primer caso, el hierro no es exportado y se acumula en los enterocitos y macrófagos. En el segundo caso, disminuye la actividad oxidasa y el hierro permanece en estado ferroso, no puede unirse a la Tf circulante acumulándose en el interior de las células, y la FPN es degradada³⁴.

Anemias microcíticas hereditarias

La clonación de los genes responsables de anemias hereditarias en modelos animales, permitió identificar proteínas transportadoras y auxiliares involucradas en el metabolismo del hierro. Es posible que mutaciones en estos mismos genes sean responsables de anemias y otras afecciones hereditarias en los seres humanos. Se han comunicado casos de anemia en seres humanos por mutaciones en los genes que se citan a continuación:

- *Anemia sideroblástica ligada al sexo (cromosoma X)*. Por mutaciones en genes que codifican proteínas necesarias para la biosíntesis del Hemo: ALAS2, ABCb7 (con ataxia) y GRLX5.²⁷

- *Protoporfiria eritropoyética*. Mutaciones en el gen de la ferroquelatasa (en 18q22).

- *Anemia microcítica hipocrómica hereditaria*. Mutaciones en los genes codificantes para DMT1, FPN, Tf, ceruloplasmina y matriptasa 2 (IRIDA).

Si bien aún no se han comunicado casos en humanos, se conocen modelos animales con anemia por mutaciones en genes de DCYTB, hefaestina, mitoferrina (protoporfiria eritropoyética), RTf1 y STEAP3^{5, 11}.

ABSTRACT

Our knowledge about iron physiology has evolved considerably in the last ten years. From a relatively simple model, in which absorption was related to transferrin receptor and storage based on ferritin, new evidence has shown that much more complex and highly regulated mechanisms are involved. According to recent research, specialized cell types and multiple genetically programmed proteins are required for normal iron metabolism. Although every single cell in human body needs iron in one way or another, four cell types have a significant role in iron metabolism. These cells are the mucosal enterocytes, the macrophages, the hepatocytes and the erythroblasts. The identification of proteins such as HFE, TfR2, hemojuvelin, hepcidin, ferroportin, hefaestin, matriptase-2, etc, are direct findings of research done in the last few years. Some of them have a role acting as transporters, some others as oxidases or reductases, and all of them participating in the fine regulation of iron metabolism. A better understanding of iron physiology allows for a deeper insight in iron deficiency and overload pathology, and also its diagnosis and treatment.

Key words: Iron, Physiology, Anemia, Hemochromatosis

BIBLIOGRAFÍA

- De Domenico I, McVey Ward D, Kaplan J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 72-81, 2008.
- Testa U. **Proteins of Iron Metabolism**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2002.
- Disorders of erythropoiesis, erythrocytes and iron metabolism. **European School of Haematology**, Forum Service Editor. 2009.
- Frazer DM, Anderson GJ. Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289: G631-G635, 2005.
- Andrews, NC. Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood* 112: 219-30, 2008.
- Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, et al. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 122: 789-801, 2005.
- Qiu A, Jansen M, Sakaris A, et al. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* 127: 917-28, 2006.
- Gisbert J, Gomollón F. An update on iron physiology. *World J Gastroenterol* 15: 4617-26, 2009.
- Graham RM, Chua AC, Herbison CE, et al. Liver iron transport. *World J Gastroenterol* 13: 4725-36, 2007.
- An-Sheng Zhang, Enns C.A. - Molecular mechanisms of normal iron homeostasis. **Am Soc Hematol Educ Program Book**. New Orleans, Louisiana, USA. December 5-8, 2009. Pages 207-214.
- Iolascon A, De Falco L, Beaumont C. Molecular basis of inherited microcytic anemia due to defects in iron acquisition or heme synthesis. *Haematologica* 94: 395-408, 2009.
- Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276: 7806-10, 2001.
- Krause A, Neitz S, Mägert HJ, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 480: 147-50, 2000.
- Nemeth E, Ganz T. The role of Hepcidin in Iron Metabolism. *Acta Haematol* 122: 78-86, 2009.
- Piperno A, Mariani R, Trombini P, Girelli D. Hepcidin modulation in human diseases: From research to clinic. *World J Gastroenterol* 15: 538-551, 2009.
- Nemeth E. Targeting the hepcidin-ferroportin axis in the diagnosis and treatment of anemias. *Adv Hematol* 2010; 2010:750643. Epub 2009 Dec 24.
- Ramsay AJ, Hooper JD, Folgueras AR, et al. Matriptase-2 (TMPRSS6): a proteolytic regulator of iron homeostasis. *Haematologica* 94: 840-9, 2009.
- Finberg KE, Heeney MM, Campagna DR, et al. Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet* 40: 569-71, 2008.
- Melis MA, Cau M, Congiu R, et al. A mutation in the TMPRSS6 gene, encoding a transmembrane serine protease that suppresses hepcidin production, in familial iron deficiency anemia refractory to oral iron. *Haematologica* 93: 1473-9, 2008.
- Lee P. Role of matriptase-2 (TMPRSS6) in iron metabolism. *Acta Haematol* 122: 87-96, 2009.
- Nemeth E. Iron regulation and erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 15: 169-75, 2008.
- Cui Y, Wu Q, Zhou Y. Iron-refractory iron deficiency anemia: new molecular mechanisms. *Kidney Int* 76: 1137-41, 2009.
- Jeong SY, David S. Glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cells in the nervous system. *J Biol Chem* 278: 27144-8, 2003.
- Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol* 88: 7-15, 2008.
- Nathan and Oski's **Hematology of Infancy and Childhood**. Saunders/Elsevier, 7th Edition, 2009.
- Lewis SM, Bain BJ, Bates I. **Dacie and Lewis' Practical Haematology**. Elsevier Ltd., Tenth Edition. 2006.
- Sheftel AD, Richardson DR, Prchal J, Ponka P. Mitochondrial iron metabolism and sideroblastic anemia. *Acta Haematol* 122: 120-133, 2009.
- Lill R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* 460: 831-8, 2009.
- Knovich MA, Storey JA, Coffman LG, et al. Ferritin for the clinician. *Blood Rev* 23: 95-104, 2009.
- Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, et al. **Hematology: Basic Principles and Practice**. Elsevier Inc., Fourth Edition. 2005.
- Brock JH, Halliday JW, Pippard MJ and Powell LW. **Iron Metabolism in Health & Disease**. W.B. Saunders, 1994.
- Camaschella C, Poggiali E. Rare types of genetic hemochromatosis. *Acta Haematol* 122: 140-5, 2009.
- McLaren GD, Gordeuk VR. Hereditary hemochromatosis: insights from the Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HEIRS) Study. **Am Soc Hematol Educ Program Book**. New Orleans, Louisiana, USA. December 5-8, 2009. Pages 195-206.
- Brissot P, Troadec MB, Bardou-Jacquet E, et al. Current approach to hemochromatosis. *Blood Rev* 22: 195-210, 2008.
- Rankin EB, Mangatt PB, Qingdu Liu, et al. Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest* 117: 1068-77, 2007.
- Paliege A, Rosenberger C, Bondke A, et al. Hypoxia-inducible factor-2 α -expressing interstitial fibroblasts are the only renal cells that express erythropoietin under hypoxia-inducible factor stabilization. *Kidney International* 77: 312-18, 2010.