



Efecto de la desferrioxamina y de la deferiprona sobre la secreción de osteocalcina en células tipo osteoblasto

I. González Suárez, J. L. Fernández Martín, M. Naves Díaz y J. B. Cannata Andía

Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral. Instituto Reina Sofía de Investigación. Hospital Universitario Central de Asturias. Universidad de Oviedo. Oviedo.

RESUMEN

La desferrioxamina y la deferiprona son dos drogas quelantes de metales que se emplean en la sobrecarga aluminica de los pacientes en diálisis. Se ha descrito que la desferrioxamina mejora la mineralización ósea, sin descensos importantes de la concentración de aluminio en hueso. Esto sugiere un efecto directo de la desferrioxamina sobre las células óseas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de desferrioxamina y deferiprona sobre células óseas de estirpe osteoblástica.

El estudio se realizó en cultivos de células MG-63. Las células se sembraron a una densidad de 15.000 cel/cm² y se llevaron a confluencia en un medio DMEM con 10% FCS. Tras 72 horas, se reemplazó el medio por el de ensayo: 1% BSA, 10⁻⁹M 1,25(OH)₂D₃ y desferrioxamina 5, 10, 20, 40, 60, 80 μM o deferiprona 15, 30, 60, 120, 180, 240 μM. Como control se utilizó Tris-HCl a pH 7,4. A las 48 horas se recogieron los sobrenadantes y se midió la osteocalcina secretada.

La desferrioxamina y la deferiprona inhibieron la secreción de osteocalcina inducida por vitamina D a concentraciones elevadas (desferrioxamina: 60 μM, 80 μM; deferiprona: 180 μM, 240 μM) mientras que la estimularon a bajas concentraciones (desferrioxamina 5 μM; deferiprona 15 μM).

Estos resultados sugieren que tanto la desferrioxamina como la deferiprona son capaces de ejercer un efecto directo sobre el metabolismo del hueso independientemente de su capacidad quelante de metales.

Palabras clave: Desferrioxamina. Deferiprona. Osteocalcina

EFFECT OF DESFERRIOXAMINE AND DEFERIPRONE ON THE 1,25(OH)₂D₃-STIMULATED OSTEOCALCIN SECRETION IN OSTEOBLAST-LIKE CELLS

SUMMARY

Desferrioxamine and deferiprone are both metal-chelating drugs often used in aluminum-overloaded dialysis patients. In these patients, desferrioxamine produces an improvement on bone mineralisation without a relevant decrease in bone aluminum. Thus, desferrioxamine might have a direct effect on bone cells. The aim of this study was to assess the effect of desferrioxamine and deferiprone on 1,25(OH)₂D₃-stimulated osteocalcin secretion in osteoblast-like cells.

Correspondencia: Dr. Jorge B. Cannata Andía
Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral
Instituto Reina Sofía de Investigación. Hospital Central de Asturias
C/ Julián Clavería, 6
33006 Oviedo. Asturias
E-mail: metoseo@hca.es

The study was carried out in MG-63 cell cultures. Cells were seeded at a density of 15,000 cel/cm² and grown to confluence for 72 hours in DMEM supplemented with 10% FCS. The medium was then replaced by another medium containing 1% BSA, 10⁻⁹M 1,25(OH)₂D₃ and desferrioxamine 5, 10, 20, 40, 60, 80 μM or deferiprone 15, 30, 60, 120, 180, 240 μM. Tris-HCl at pH 7.4 was used as control. After 48 hours, supernatants were collected for the measurement of secreted osteocalcin.

Desferrioxamine and deferiprone, at high doses (desferrioxamine: 60 μM, 80 μM; deferiprone: 180 μM, 240 μM), inhibited the 1,25(OH)₂D₃-induced osteocalcin secretion. On the contrary, at lower doses (desferrioxamine 5 μM; deferiprone 15 μM) stimulated the secretion.

In summary, these results suggest that desferrioxamine and deferiprone exert a direct effect on bone cell metabolism that might be independent from their metal-chelating properties.

Key words: Desferrioxamine. Deferiprone. Osteocalcin.

INTRODUCCIÓN

La desferrioxamina (DFO) y la deferiprona (L1) son dos drogas utilizadas tanto en el tratamiento de la sobrecarga férrica en pacientes talasémicos^{1,2} como en el tratamiento de la intoxicación aluminica^{3,4}, en pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC).

En estos últimos, la eliminación del aluminio durante la diálisis se ve muy limitada ya que el metal se encuentra unido a proteínas plasmáticas de elevado peso molecular que no son dializables. Tanto la desferrioxamina como la deferiprona son capaces de desplazar el metal de sus proteínas transportadoras, con lo que se elevan los niveles séricos de Al ultrafiltrable⁵. También son capaces de eliminar Al de los tejidos³. Así, se ha descrito que el tratamiento con desferrioxamina mejora la mineralización ósea en pacientes con osteodistrofia renal inducida por aluminio. Sin embargo, aunque se observa un descenso en los niveles de Al en la superficie de osteoide, la concentración total de aluminio en el hueso no disminuye significativamente^{6,7}. Además, se ha descrito que la desferrioxamina es capaz de alterar el metabolismo de las células óseas, incrementando la producción de fosfatasa alcalina y la secreción de osteocalcina en osteoblastos *in vivo*^{8,9}. Todo ello, en conjunto, sugeriría un posible efecto directo de la desferrioxamina sobre el hueso, el cual sería independiente de su capacidad para extraer Al del mismo.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la desferrioxamina y la deferiprona sobre la producción de osteocalcina —un conocido marcador de recambio óseo— estimulada por calcitriol en células tipo osteoblasto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo este estudio se utilizó una línea celular de osteosarcoma humano (MG-63). Aunque se trata de una línea de origen tumoral, varios estudios han demostrado su capacidad para proporcionar una respuesta similar a la de osteoblastos diferenciados. Esto es, la capacidad para sintetizar fosfatasa alcalina, osteocalcina y otras proteínas dependientes de vitamina K cuando su diferenciación se ve estimulada con calcitriol^{10,11}.

Durante el estudio las células se mantuvieron en frascos de cultivo de 75 cm² (NUNC®) en un medio DMEM suplementado con FCS al 10% (Seromed) según condiciones previamente descritas⁹.

La desferrioxamina utilizada fue mesilato de desferrioxamina (Ciba-Geigy, Desferal) y la deferiprona (L1 ó 1,2 dimetil-3-hidroxipiridin-4-ona) fue cedida por el Dr. G. J. Kontoghiorghes.

Para estudiar el efecto de ambas drogas sobre la secreción de osteocalcina se sembraron las células en placas de 96 pocillos a una densidad de 15.000 células/cm² en 200 μl de medio suplementado con un 10% FCS. Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C y en atmósfera húmeda con un 5% de CO₂. Las células se llevaron a confluencia manteniéndolas en este medio durante 72 h. En ese momento se sustituyó el medio por otro sin FCS pero con BSA 0,1% y calcitriol 10⁻⁹M. Se añadieron las distintas concentraciones a ensayar de desferrioxamina (5, 10, 20, 40, 60, 80 μM) y deferiprona (15, 30, 60, 120, 180, 240 μM) diluidas en Tris-HCl 5 mM, pH 7,4. Como control se utilizó Tris-HCl 5 mM, pH 7,4. Para cada una de las concentraciones se realizaron 6 replicados y cada experimento se llevó a cabo por triplicado.

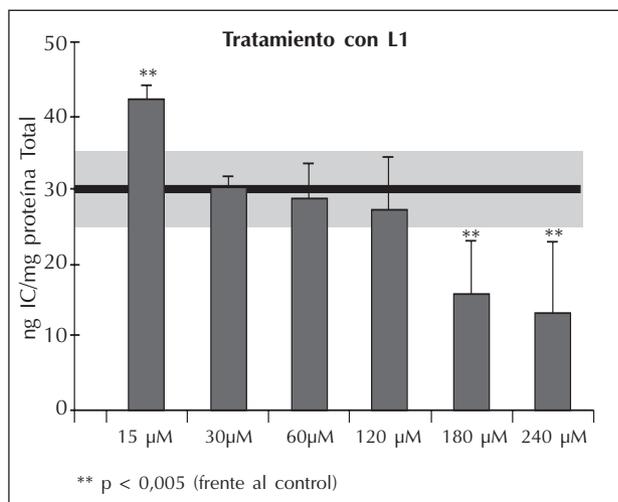


Fig. 1.—Secreción de osteocalcina en cultivos tratados con Desferriprona (valores normalizados frente a mg de proteína total). La línea central representa la secreción de osteocalcina en el grupo control.

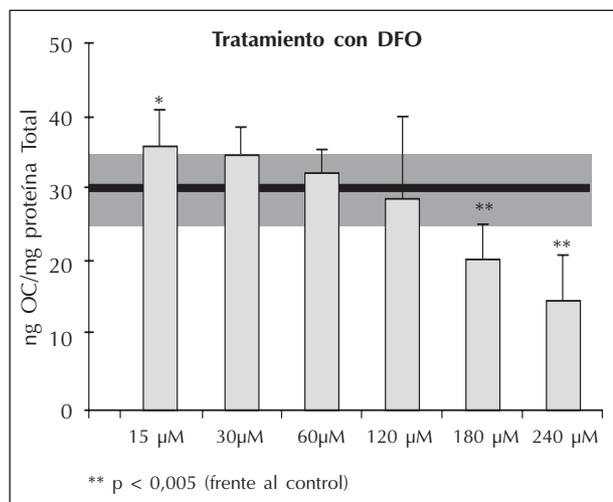


Fig. 2.—Secreción de osteocalcina en cultivos tratados con Desferrioxamina (valores normalizados frente a mg de proteína total). La línea central representa la secreción de osteocalcina en el grupo control.

La osteocalcina secretada se determinó mediante ensayo inmunoradiométrico (IRMA) (Human Osteocalcin Kit, Nichols Institute). Los valores se expresaron como ng de osteocalcina corregidos frente a los mg de proteína total determinados mediante el método de Bradford¹².

El análisis estadístico de los resultados, expresado como media \pm desviación estándar se llevó a cabo utilizando el paquete informático SPSS 8.0 para Windows.

RESULTADOS

Tanto la desferrioxamina como la deferiprona fueron capaces de inhibir la secreción de osteocalcina inducida por calcitriol a concentraciones elevadas (desferrioxamina: 60 μ M, 80 μ M; deferiprona: 180 μ M, 240 μ M). Dicha inhibición fue máxima con las concentraciones más elevadas de ambos quelantes, (desferrioxamina: 14,11 \pm 5,93 vs 28,14 \pm 7,43 ng osteocalcina/mg de proteína y deferiprona: 13,02 \pm 9,58 vs 28,14 \pm 7,43 ng osteocalcina/mg de proteína; $p < 0,005$) con las que se logró reducir la síntesis de osteocalcina a la mitad (desferrioxamina 80 μ M y deferiprona 240 μ M, $p < 0,005$) (figs. 1 y 2). Por el contrario, a bajas concentraciones ambas estimularon la secreción de osteocalcina. Se observó un incremento de un 25% con desferrioxamina 5 μ M (35,48 \pm 4,79 vs 28,14 \pm 7,43 ng osteocalcina/mg de proteína total, $p < 0,024$) y de un 50% con deferiprona 15 μ M (42,30 \pm 2,15 vs 28,14 \pm 7,43 ng osteocalcina/mg de proteína total, $p < 0,005$).

DISCUSIÓN

El aluminio es un elemento capaz de alterar la mineralización ósea en pacientes de diálisis provocando osteomalacia. Se ha descrito que este metal es capaz de inhibir la secreción y/o síntesis de osteocalcina en líneas celulares tipo osteoblasto^{13,14} y en ratas sobrecargadas con aluminio¹⁵. La desferrioxamina es una droga quelante que es capaz de extraer aluminio de los depósitos tisulares así como de liberar al mismo de su principal transportador plasmático (la transferrina) incrementando los niveles de Al ultrafiltrable (dializable)¹⁶ incluso cuando se emplea a dosis muy bajas¹⁷. Si bien la desferrioxamina fundamentalmente a esos dos niveles, su mayor efecto beneficioso sería a través de la eliminación de aluminio del frente de mineralización del hueso permitiendo de nuevo la mineralización del mismo, y tal vez, también disminuyendo la concentración de aluminio de los osteoblastos favoreciendo su actividad y su capacidad de mejorar el remodelado óseo.

Es probable que éste no sea el único mecanismo de acción de los quelantes, dado que si bien tras su utilización se ha observado mejoría de los parámetros histológicos, que a su vez se correlacionan con el descenso significativo de Al en hueso¹⁸. Otros estudios, clínicos¹⁹ y experimentales²⁰, han demostrado una mejoría en los mismos parámetros con descensos mínimos del contenido total de aluminio en hueso. Estos hallazgos

sugieren que los quelantes podrían tener un efecto adicional sobre el metabolismo de las células óseas independientemente de su capacidad para extraer aluminio.

En nuestro estudio, hemos observado que tanto desferrioxamina como deferiprona a baja dosis son capaces de estimular la secreción de osteocalcina en osteoblastos, mientras que a dosis elevadas ambas drogas inhiben la secreción de osteocalcina. El efecto a baja dosis estaría de acuerdo con lo descrito *in vivo* por otros autores⁸ que han observado un incremento anómalo de los niveles de osteocalcina sérica tras el tratamiento con desferrioxamina en pacientes en diálisis. Sin embargo, en dicho estudio, el incremento de osteocalcina sérica no se debió a un incremento de la actividad osteoblástica sino a un incremento de fragmentos de osteocalcina procedentes de la degradación de la osteocalcina intacta circulante y de la matriz proteica del hueso como consecuencia de un aumento de la resorción ósea. Dichos incrementos, no se observaron cuando se empleó un kit IRMA que detecta solo osteocalcina intacta y no fragmentos de la misma.

En estudios previos de nuestro grupo se observó que la desferrioxamina fue capaz de incrementar la actividad fosfatasa alcalina en células MG-63, los resultados aportados en el presente estudio corroboran que tanto esta droga como, así también, la deferiprona son capaces de incrementar la actividad osteoblástica a bajas dosis⁹.

Este comportamiento bimodal de los quelantes observado en nuestros estudios podría estar debido al efecto quelante que tanto desferrioxamina como deferiprona tienen sobre el hierro. El hierro actúa como cofactor de la ribonucleótido reductasa, un enzima implicado en la síntesis de DNA. A dosis bajas de desferrioxamina y deferiprona se produciría una inhibición de la proliferación celular⁹, sin embargo, el metabolismo celular no se vería afectado, por lo que se favorecería la diferenciación celular y la secreción de osteocalcina aumentaría. A concentraciones elevadas de ambas drogas, el metabolismo celular sí se vería afectado (el hierro es un elemento esencial para las células eucariotas) por lo que la secreción de osteocalcina disminuiría.

En resumen, estos resultados apoyan la hipótesis de que el efecto beneficioso que tienen los quelantes administrados a baja dosis como tratamiento de la sobrecarga aluminica podría no ser debido exclusivamente a la capacidad de extracción de aluminio del hueso sino también a un incremento de la actividad osteoblástica inducida de forma directa por estos fármacos.

Agradecimientos

Este estudio ha sido posible gracias a la ayuda de la Sociedad Española de Nefrología (Beca SEN) y al Dr. G. J. Kontoghiorghes por haber cedido la Defेरiprona. Ignacio González Suárez ha disfrutado de una beca predoctoral de la Fundación Renal (IRSFRIAT) y de la Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y de la Tecnología (FICYT). En la actualidad disfruta de una beca BEFI del Fondo de Investigaciones sanitarias (Instituto de Salud Carlos III).

BIBLIOGRAFÍA

1. Moeschlin S, Schnider U: Treatment of primary and secondary hemochromatosis and acute iron poisoning with a new potent iron eliminating agent (Desferrioxamine B). *N Engl J Med* 269: 57-66, 1963.
2. Olivieri NF, Templeton DM, Koren G y cols.: Evaluation of the oral iron chelator 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one (L1) in iron-loaded patients. *Ann N Y Acad Sci* 612: 369-377, 1990.
3. Ackrill P, Ralston AJ, Day JP: Role of desferrioxamine in the treatment of dialysis encephalopathy. *Kidney Int Suppl* 18: S104-S107, 1986.
4. Kontoghiorghes GJ: Chemical, pharmacological, toxicological and therapeutic advances of deferiprone (L1) and other iron and aluminium chelators. *Arch Toxicol Suppl* 18: 202-214, 1996.
5. García Alonso JI, López García A, Pérez Parajón J, Blanco González E, Sanz Medel A, Cannata JB: High performance liquid chromatography methods for studying protein binding of aluminium in human serum in the absence and in the presence of desferrioxamine. *Clin Chim Acta* 189 (1): 69-79, 1990.
6. Andress DL, Nebeker HG, Ott SM y cols.: Bone histologic response to deferoxamine in aluminium-related bone disease. *Kidney Int* 31 (6): 1344-1350, 1987.
7. Jorgetti V, Soeiro NM, Mendes V y cols.: Aluminium-related osteodystrophy and desferrioxamine treatment: role of phosphorus. *Nephrol Dial Transplant* 9 (6): 668-674, 1994.
8. Davie MW, Worsfold M, Sharp CA, Perks J, Day JP: Anomalous rise of serum osteocalcin following desferrioxamine treatment in aluminium intoxication. *Nephron* 65 (2): 245-248, 1993.
9. Naves Díaz ML, Elorriaga R, Canteros A, Cannata Andía JB: Effect of desferrioxamine and deferiprone (L1) on the proliferation of MG-63 bone cells and on phosphatase alkaline activity. *Nephrol Dial Transplant* 13 (Supl. 3): 23-28, 1998.
10. Franceschi RT, Linson CJ, Peter TC, Romano PR: Regulation of cellular adhesion and fibronectin synthesis by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *J Biol Chem* 262 (9): 4165-4171, 1987.
11. Bonewald LF, Kester MB, Schwartz Z y cols.: Effects of combining transforming growth factor beta and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on differentiation of a human osteosarcoma (MG-63). *J Biol Chem* 267 (13): 8943-8949, 1992.
12. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.
13. Fanti P, Kindy MS, Mohapatra S, Klein J, Colombo G, Malleuche HH: Dose-dependent effects of aluminum on osteocalcin synthesis in osteoblast-like ROS 17/2 cells in culture. *Am J Physiol* 263 (6 Pt 1): E1113-E1118, 1992.

EFFECTO DE LA DESFERRIOXAMINA Y DE LA DEFERIPRONA SOBRE LA SECRECIÓN...

14. Lajeunesse D, Moreau R, Hobbs W, Qui W, Lafond J, Guggino SE: Influence of aluminum on the regulation of PTH- and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -dependent pathways in the rat osteosarcoma cell line ROS 17/2.8. *J Bone Miner Res* 13 (6): 962-969, 1998.
15. Gómez-Alonso C, Menéndez-Rodríguez P, Virgos-Soriano MJ, Fernández-Martín JL, Fernández-Coto MT, Cannata-Andía JB: Aluminum-induced osteogenesis in osteopenic rats with normal renal function. *Calcif Tissue Int* 64 (6): 534-541, 1999.
16. Ackrill P, Day JP: The use of desferrioximine in dialysis-associated aluminium disease. *Contrib Nephrol* 102: 125-134, 1993.
17. Canteros A, Díaz-Corte C, Fernández-Martín JL, Gago E, Fernández-Merayo C, Cannata J: Ultrafiltrable aluminium after very low doses of desferrioxamine. *Nephrol Dial Transplant* 13 (6): 1538-1542, 1998.
18. Malluche HH, Smith AJ, Abreo K, Faugere MC: The use of deferoxamine in the management of aluminium accumulation in bone in patients with renal failure. *N Engl J Med* 311 (3): 140-144, 1984.
19. Brown DJ, Dawborn JK, Ham KN, Xipell JM: Treatment of dialysis osteomalacia with desferrioxamine. *Lancet* 2 (8294): 343-345, 1982.
20. Verbeelen D, Smeyers-Verbeke J, Van Hooff I, Van der Straeten A, De Roy G: The effect of desferrioxamine on concentration and distribution of aluminum in bone. *Kidney Int* 30 (1): 68-73, 1986.