

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Terapia celular en un modelo murino de protoporfiria
eritropoyética**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María García Bravo

DIRECTORES:

Rafael Enríquez de Salamanca Lorente
Antonio Fontanellas Romá

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

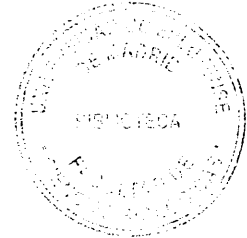


5324988696

TG16,533
GAR
ter

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA



**TERAPIA CELULAR
EN UN MODELO MURINO DE
PROTOPORFIRIA ERITROPOYÉTICA**

María García Brava

TESIS DOCTORAL

2007

23675156X

Este trabajo ha sido realizado en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre bajo la dirección del Prof. Dr. Rafael Enríquez de Salamanca Lorente y Dr. Antonio Fontanellas Romá. El Dr. Jesús Pérez Gil del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Biología (UCM) ha tutorado esta tesis.

La financiación necesaria para realizar este trabajo ha sido concedida por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) y por la Fundación Mutua Madrileña.

A mis padres, Alberto y Consuelo

A Fernando

Quiero agradecer en primer lugar al Dr. Enriquez de Salamanca y al Dr. Fontanellas Romá su dedicación como directores de este trabajo. Al recibirme en el Laboratorio de Porfirias me han permitido asomar la cabeza al 'mundo de la ciencia'.

Algunos experimentos realizados en este estudio se llevaron a cabo en la División de Hematopoyesis del CIEMAT. Quiero agradecer su disponibilidad para colaborar, especialmente a José Carlos Segovia por su implicación directa en este trabajo y su ayuda en la interpretación de los resultados y a Óscar Quintana por cuidar de los animales y ayudar en la toma de muestras y realización de los trasplantes.

A Salvador y Piedad, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre, quiero agradecerles su ayuda con los hígados 'recalcitrantes'.

Las determinaciones de la actividad de la citocromo C oxidasa se realizaron en el Laboratorio de Enfermedades Mitocondriales del Hospital Universitario 12 de Octubre, bajo la atenta mirada de Pilar del Hoyo, que no dudó en sacar tiempo para enseñarme los secretos de la técnica, además de tener siempre a mano unos sabios consejos vacacionales.

La Dra. Vegh nos ayudó en la elección de los marcadores tumorales y en la interpretación de los resultados relacionados con los mismos.

La Dra. Muñoz, del Servicio de Bioquímica del Hospital Universitario 12 de Octubre nos ayudó con los parámetros séricos de función hepática.

A la profesora María Teresa González Manteiga quiero agradecerle esa llamada de teléfono que me llevó hasta la puerta del Laboratorio de Porfirias; en cierto modo ella ha hecho posible que hoy esté escribiendo estas palabras.

Macu, tú has participado en el desenlace de esta aventura, con tu chispa y con tus manos, que ya no hay 'fish' ni 'inmuno' que se te resistan. Al final, han visto la luz, tu Lucía y mi Tesis. Gracias por todos los cafés, 'sin acritud, por supuesto'.

Elena, has llegado justo al principio del final. Gracias a tu trabajo con los pacientes he podido darle el último empujón a la Tesis. Los círculos se cierran, antes o después. ¿Cuándo empezaremos el siguiente?

Y otro círculo que empieza. Susana, de nuevo compañeras; un placer. Estuviste al inicio de este trabajo y nos volvemos a encontrar al final. Gracias por todo tu apoyo y por acompañarme en los principios y en aquellos 'one-day-cloning' con banda sonora de fondo de viernes por la tarde.

Hay dos personas que en estos años, día a día, me han proporcionado un soporte científico constante, pues con su experiencia me han servido de guía y me han transmitido una manera de pensar y de avanzar en este camino. Y no menos importante ha sido el apoyo personal; puedo decir que me

habéis cuidado durante todo este tiempo. A vosotros, María José y Manuel, gracias. Ya sabemos, 'lo que no me aniquila me hace más fuerte'.

Por último quiero agradecer a mis padres su cariño y su apoyo incondicional en todo; especialmente por ayudarme pacientemente, y muchas veces con vuestro silencio, a seguir siempre hacia delante durante la elaboración de este trabajo. Fernando, de las infinitas cosas por las que podría agradecerte hoy quiero darte las gracias por el empeño que pones siempre para que no me acomode y siga dando pasos, siempre hacia delante, siempre superándome. Gracias por la ilusión que pones en todo. Infinitos.

ÍNDICE DE FIGURAS	15
ÍNDICE DE TABLAS	19
ABREVIATURAS	23
INTRODUCCIÓN	29
1 LAS PORFIRIAS	31
1. A Papel biológico del grupo hemo	31
1. B Ruta de síntesis del hemo	32
1. B.1 δ -ácido aminolevulínico sintasa	32
1. B.2 δ -Aminolevulinato deshidratasa	33
1. B.3 Porfobilinógeno desaminasa	34
1. B.4 Uroporfirinógeno III sintasa	34
1. B.5 Uroporfirinógeno descarboxilasa	35
1. B.6 Coproporfirinógeno oxidasa	36
1. B.7 Protoporfirinógeno oxidasa	36
1. B.8 Ferroquelatasa	36
1. C Las porfirinas	37
1. C.1 Generalidades de las porfirinas	37
1. C.2 Propiedades físicas y químicas de las porfirinas	38
1. D Regulación de la síntesis del hemo	39
1. D.1 Regulación de la síntesis del hemo hepático	40
1. D.1.A <i>Por la enzima reguladora: ALAS1</i>	40
1. D.1.B <i>Por el producto final: hemo</i>	41
1. D.2 Regulación de la síntesis del hemo en células eritroides	42
1. D.3 Síntesis del hemo en células no eritroides	43
1. E Catabolismo del hemo	44
1. F Las porfirias	45
2 PROTOPORFIRIA ERITROPOYÉTICA	48
2. A Definición y manifestaciones clínicas en la PPE	48
2. B Caracterización bioquímica de la PPE	49
2. C Ferroquelatasa	49
2. C.1 Introducción general	49
2. C.2 Biogénesis, propiedades y estructura tridimensional de la ferroquelatasa	50
2. C.3 ADNc y gen de la ferroquelatasa	51
2. D Genética molecular de la PPE	52
2. D.1 La ferroquelatasa en la PPE	52
2. D.2 Herencia de la PPE	52
2. D.2.A <i>Modulación de la expresión del gen de la ferroquelatasa</i>	53
2. E Alteraciones hematológicas en la PPE	54
2. F Fotosensibilidad en la PPE	54
2. F.1 Tratamiento de la fotosensibilidad	55

2. G	Enfermedad hepática en la PPE.....	55
2. G.1	Papel de la protoporfirina en la enfermedad hepática	58
2. G.2	Marcadores tumorales, citoquinas y enfermedad hepática.....	58
2. G.3	Cadena respiratoria mitocondrial y enfermedad hepática en la PPE	59
2. G.4	Tratamiento de la enfermedad hepática en la PPE.....	61
3	MODELOS ANIMALES DE PPE.....	62
3. A	Descripción del modelo murino de PPE <i>Fech^{m1Pas}/Fech^{m1Pas}</i>	63
4	TERAPIA CELULAR DE LA PPE.....	65
4. A	Antecedentes de terapia celular y terapia génica en el modelo murino de PPE	65
4. B	Terapia celular de la médula ósea en el modelo murino de PPE	66
	OBJETIVOS	69
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
1	ANIMALES	75
1. A	Cría de ratones	75
1. B	Grupos experimentales.....	75
2	PROCESADO DE MUESTRAS	78
2.A	Sacrificio de animales.....	78
2.B	Extracción de muestras	78
2. B.1	Sangre	78
2. B.2	Células de médula ósea.....	78
2. B.3	Hígado	79
3	MÉTODOS	80
3. A	Genotipado de los ratones	80
3. B	Trasplante de médula ósea	81
3. B.1	Irradiación de los animales receptores	81
3. B.2	Trasplante de médula ósea	82
3. B.3	Tratamientos	82
3. C	Bioquímica	82
3. C.1	Determinación de las concentraciones de porfirinas	82
3. C.2	Determinación de parámetros hematológicos	83
3. C.3	Determinación de parámetros séricos de función hepática	83
3. C.4	Determinación de la actividad enzimática de la ferroquelatasa	83
3. C.5	Determinación de la actividad de la citocromo C oxidasa	84
3. C.6	Determinación de las concentraciones de marcadores tumorales en homogenados de hígado.....	85
3. C.7	Cuantificación de proteínas.....	85
3. D	Histología	85
3. D.1	Inmunohistoquímica	86

3. D.2	Hibridación 'in situ' con sondas fluorescentes	87
3. D.3	Combinación de inmunohistoquímica e hibridación 'in situ' con sondas fluorescentes	89
3. E	Citometría de flujo	90
3. E.1	Detección de eritrocitos fluorescentes circulantes	90
4	ANÁLISIS DE DATOS	91
4. A	Captura y tratamiento de imágenes	91
4. B	Análisis estadístico	91
4. C	Criterio de comparación entre grupos	92
RESULTADOS		95
1	ALTERACIONES ERITROPOYÉTICAS.....	97
1. A	Porfirinas en plasma	97
1. B	Porfirinas en eritrocitos	99
1. C	Parámetros hematológicos	100
1. D	Porcentaje de células donantes en la médula ósea de los animales receptores	101
1. E	Porcentaje de fluorocitos en sangre periférica de los animales receptores	102
2	MANIFESTACIÓN HEPÁTICA	104
2. A	Porfirinas en hígado.....	104
2. B	Actividad de la ferroquelatasa en hígado	105
2. C	Parámetros de función hepática	106
2. D	Concentración de marcadores tumorales en homogenados de hígado ...	111
2. E	Actividad del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial en homogenados de hígado	113
2. F	Estudio histológico del hígado	115
2. F.1	Histología en cortes de hígado de ratones 'fch/fch'.....	115
2. F.2	Histología en cortes de hígado de los grupos TC2 y TC3	117
2. F.3	Histología en cortes de hígado del grupo TC4	120
2. F.4	Detección de células de origen donante en el hígado de los animales receptores	121
2. F.5	Caracterización de las células de origen donante en el hígado de los animales receptores	124
DISCUSIÓN.....		131
1	MODELO ANIMAL Fech^{m1Pas} / Fech^{m1Pas}	133
2	ALTERACIONES ERITROPOYÉTICAS.....	135
2. A	Normalización de las concentraciones de porfirinas en glóbulos rojos y plasma	137

2. B	Corrección hematológica parcial tras el trasplante de médula ósea sana	138
.....		
3	ALTERACIONES HEPÁTICAS	140
3. A	Alteraciones hepáticas. Implicaciones desde el punto de vista de la PPE	140
.....		
3. A.1	Reducción significativa de porfirinas en el hígado nueve meses después del trasplante de médula ósea sana	142
3. A.2	La actividad de la ferroquelatasa en hígado se duplica con la terapia celular	143
3. A.3	Recuperación parcial de la función hepática después de la terapia celular	143
3. A.4	Papel protector de la citocromo C oxidasa frente a la citotoxicidad de la protoporfirina en los ratones jóvenes con PPE	144
3. A.5	Marcadores tumorales y PPE	146
3. A.6	Reversión parcial de las alteraciones histológicas del hígado en ratones PPE trasplantados con médula ósea sana	148
3. B	Contribución de las células donantes de médula ósea a la fisiopatología hepática del ratón con PPE	151
.....		
3. B.1	Plasticidad celular y daño hepático	151
3. B.1.A	<i>Interés del modelo murino de PPE para el estudio de procesos de plasticidad celular</i>	153
3. B.2	La médula ósea donante contribuye a la reparación hepática en el modelo murino de PPE	154
3. B.3	La médula ósea donante contribuye a la regeneración hepática en el modelo murino de PPE	157
3. B.3. A	<i>Contribución de la médula ósea a los progenitores hepáticos en el modelo murino de PPE</i>	157
3. B.3. B	<i>Un porcentaje significativo de hepatocitos provienen de la médula ósea donante en los ratones con PPE trasplantados</i>	160
.....		
COROLARIO DE RESULTADOS		167
.....		
CONCLUSIONES		173
.....		
BIBLIOGRAFÍA		177

T616.633
GAR
ter

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		página
1	Hemoproteínas	31
2	Ruta de biosíntesis del grupo hemo	33
3	Ciclación enzimática y no enzimática de HMB	35
4	Inserción de hierro en la protoporfirina IX para formar hemo catalizada por la ferroquelatasa	37
5	Estructura de las porfirinas	37
6	Espectro de absorción de una porfirina	38
7	Destino del hemo hepático	40
8	Clasificación de las porfirias según su origen y según su sintomatología	46
9	Estructura tridimensional de la ferroquelatasa humana	50
10	Ejemplo de lesiones cutáneas agudas y crónicas en pacientes con PPE	55
11	Esquema de la progresión de la enfermedad hepática en la PPE	57
12	Complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial	60
13	Grupos experimentales	76
14	Concentración de porfirinas en plasma y glóbulos rojos en el grupo TC4	99
15	Citometría de flujo en células de sangre periférica	102
16	Correlación entre fluorocitos y células de médula ósea Y-positivas	103
17	Concentraciones plasmáticas de AST, ALT, fosfatasa alcalina y bilirrubina total en grupo TC4	110
18	Concentraciones de AFP, CA 19.9 y TNF- α en ratones control +/+, <i>fch/fch</i> y grupo TC4	113
19	Tinción con hematoxilina-eosina en cortes de hígado de ratones control sanos y <i>fch/fch</i>	116
20	Tinción con hematoxilina-eosina y tinción tricrómica de Masson en cortes de hígado de grupos TC2 y TC3	119
21	Tinción hematoxilina-eosina de cortes de hígado de grupo TC4	120
22	FISH para el cromosoma Y en hígado de ratón macho sano	121
23	FISH para el cromosoma Y en hígado de los ratones de terapia celular	123
24	Marcaje inmunohistoquímico con α -sma en sección histológica del hígado de un ratón control sano y de un ratón <i>fch/fch</i>	125
25	Porcentaje de células de origen donante (Y+) positivas para albúmina, α -sma y CK19, referidas al número total de células marcadas con el respectivo anticuerpo en hígado	126
26	Marcaje inmunohistoquímico de albúmina y α -sma en cortes de hígado de los ratones de terapia celular	127
27	Marcaje inmunohistoquímico de CK19 y CD45 en cortes de hígado de los ratones de terapia celular	128

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		página
1	Concentración de porfirinas en plasma y de protoporfirina en glóbulos rojos	98
2	Parámetros hematológicos estudiados en controles sanos y enfermos y en los grupos TC2 y TC3	100
3	Concentración de protoporfirina en hígado	105
4	Actividad de la ferroquelatasa en hígado	106
5	Concentraciones plasmáticas de AST y de ALT en grupos control y en los grupos TC2 y TC3	108
6	Concentraciones plasmáticas de fosfatasa alcalina y de bilirrubina total en grupos control y en los grupos TC2 y TC3	109
7	Concentraciones de AFP, CA 19.9 y TNF- α en ratones control +/+ y ratones del grupo TC1	112
8	Actividad del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial referida a la actividad de la citrato sintasa	114
9	Porcentajes de células positivas para el marcaje con sondas específicas de cromosoma Y referidas al número total de células contadas	122

ABREVIATURAS

2-AAF: 2- acetilaminofluoreno

+/+ : genotipo silvestre

A

α -sma: (*alpha smooth muscle actin*) actina del músculo liso

Acetil-coA: acetil coenzima A

ALA: ácido aminolevulínico

ALAD: aminolevulinato deshidratasa

ALAS: ácido aminolevulínico sintasa

ALB: albúmina

ALT: alanino aminotransferasa

AST: aspartato aminotransferasa

ATP: adenosín trifosfato

C

CCl₄: tetracloruro de carbono

CK19: citoqueratina 19

CO: monóxido de carbono

CPH: coproporfiria hereditaria

CPO: coproporfirinógeno oxidasa

Cy3: cianina 3

D

DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato

E

E-GFP: (*enhanced green fluorescent protein*) proteína verde fluorescente

F

FADH₂: flavín adenin dinucleótido reducido

FECH: ferroquelatasa

FISH: hibridación *in situ* con fluorescencia

FITC: isotiocianato de fluoresceína

FSC: *forward scatter*

G

G-CSF: (*granulocyte colony stimulating factor*) factor estimulante de colonias de granulocitos

GSH: glutatión

H

Hb.: hemoglobina

HEP: porfiria hepatoeritropoyética

HMB: hidroximetilbilano

HO: hemooxigenasa

Hto.: hematocrito

I

IUB: Unión Internacional de Bioquímica

M

MO: médula ósea

N

NADH: nicotinamida adenín dinucleótido reducida

NADPH: nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato

NO: óxido nítrico

P

PAI: porfiria aguda intermitente

PBG: porfobilinógeno

PBGD: porfobilinógeno desaminasa

PCE: porfiria congénica eritropoyética

PCT: porfiria cutánea tarda

PP: protoporfirina

PPE: protoporfirina eritropoyética

PPO: protoporfirinógeno oxidasa

PV: porfiria variegata

R

RBC: (*red blood cells*) recuento de glóbulos rojos

S

SCC: *side scatter*

T

TAA: tioacetamida

TC: terapia celular

U

UROD: uroporfirinógeno descarboxilasa

UROS: uroporfirinógeno III sintasa

V

VCM: volumen corpuscular medio

INTRODUCCIÓN

LAS PORFIRIAS 1

1. A Papel biológico del grupo hemo

El hemo es el grupo prostético de las hemoproteínas celulares implicadas en un amplio espectro de funciones biológicas esenciales entre las que destacan la unión al oxígeno (hemoglobina, mioglobina), metabolismo del oxígeno (oxidasas, peroxidasas, catalasas e hidroxilasas) y transferencia de electrones (citocromos) (Anderson y cols., 2001).

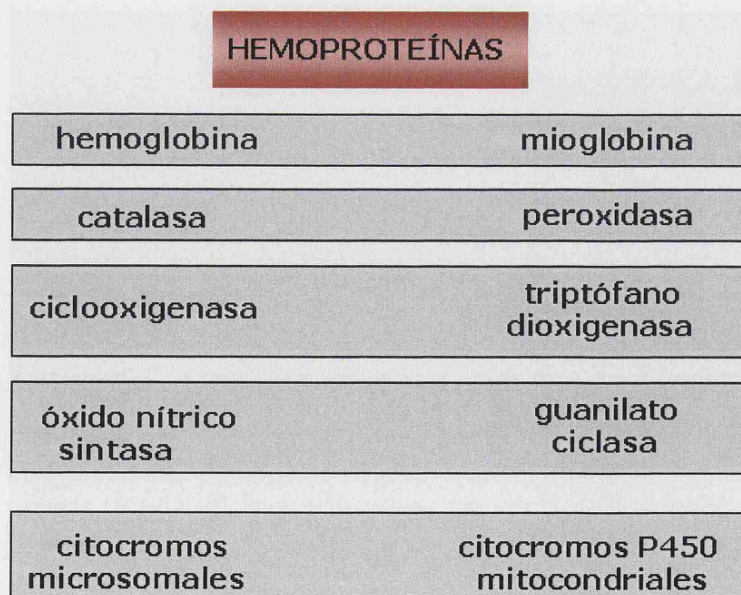


Figura 1. Diversas hemoproteínas.

El hemo se sintetiza en la mayoría de las células, a excepción de los eritrocitos maduros y otras células en las últimas etapas de su diferenciación; esto es debido a que todas las células del organismo necesitan hemo para la formación de los citocromos mitocondriales implicados en la cadena respiratoria mitocondrial. No obstante, los requerimientos varían significativamente de unos tejidos a otros; en el tejido eritroide y en el hígado la tasa de síntesis del hemo es mucho mayor que en otros tejidos, puesto que se necesitan grandes cantidades de hemo para la formación de hemoglobina en la médula ósea y de citocromos P450 en el hígado (Ponka, 1997).

1. B Ruta de síntesis del hemo

La síntesis del hemo está estrictamente regulada debido a la toxicidad de los intermediarios de la ruta.

En la ruta biosintética del hemo participan ocho enzimas que convierten secuencialmente la glicina y la acetil-CoA en hemo. La primera y las tres últimas enzimas son mitocondriales, el resto son citosólicas. Todas estas enzimas son codificadas por ADN nuclear.

1. B.1 δ -ácido aminolevulínico sintasa

La δ -ácido aminolevulínico sintasa, ALAS (EC.2.3.1.37), primera enzima de la ruta, cataliza la condensación de glicina y succinil coenzima A para formar ácido aminolevulínico (ALA), que es destinado exclusivamente a la síntesis de hemo. Esta enzima es un homodímero y se localiza en la mitocondria, donde se produce succinil coenzima A (succinil-CoA) por el ciclo de los ácidos tricarbónicos y que, además, constituye la fuente de energía más importante de la ruta de síntesis del grupo hemo (Jordan y Laghai-Newton, 1986). Su ubicación exacta está en la membrana mitocondrial interna, orientada hacia la matriz mitocondrial.

La ALAS está codificada por dos genes nucleares, un gen constitutivo, *ALAS1*, expresado en todas las células y localizado en el cromosoma 3p21 y un gen eritroide específico, *ALAS2*, expresado sólo en el hígado fetal y la médula ósea

adulto y localizado en una subregión distal de Xp.11.21. Ambos genes están organizados en 11 exones.

1. B.2 δ -Aminolevulinato deshidratasa

La δ -aminolevulinato deshidratasa, ALAD (EC.4.2.1.24), cataliza la condensación de dos moléculas de ALA para formar el monopirrol porfobilinógeno (PBG). Está compuesta por ocho subunidades idénticas de 36 kD y contiene cuatro sitios catalíticos (Anderson y Desnick, 1979). Esta enzima requiere un átomo de zinc por subunidad y un grupo sulfidrilo intacto para su actividad óptima. Es la enzima más abundante de la ruta de síntesis del grupo hemo y en el hígado de mamíferos la actividad de la ALAD es de 80 a 100 veces mayor que la de la ALAS.

El gen de la ALAD se ha localizado en la región q34 del cromosoma 9 y está constituido por 13 exones. Tiene dos exones, 1A y 1B, que se procesan alternativamente y se empalman con el exón 2, donde comienza la región codificante; cada exón 1 tiene su propio promotor. El ARNm de la ALAD que contiene el exón 1A es ubicuo y el ARNm de la ALAD que contiene el exón 1B se expresa sólo en células eritroides (Kaya y cols., 1994).

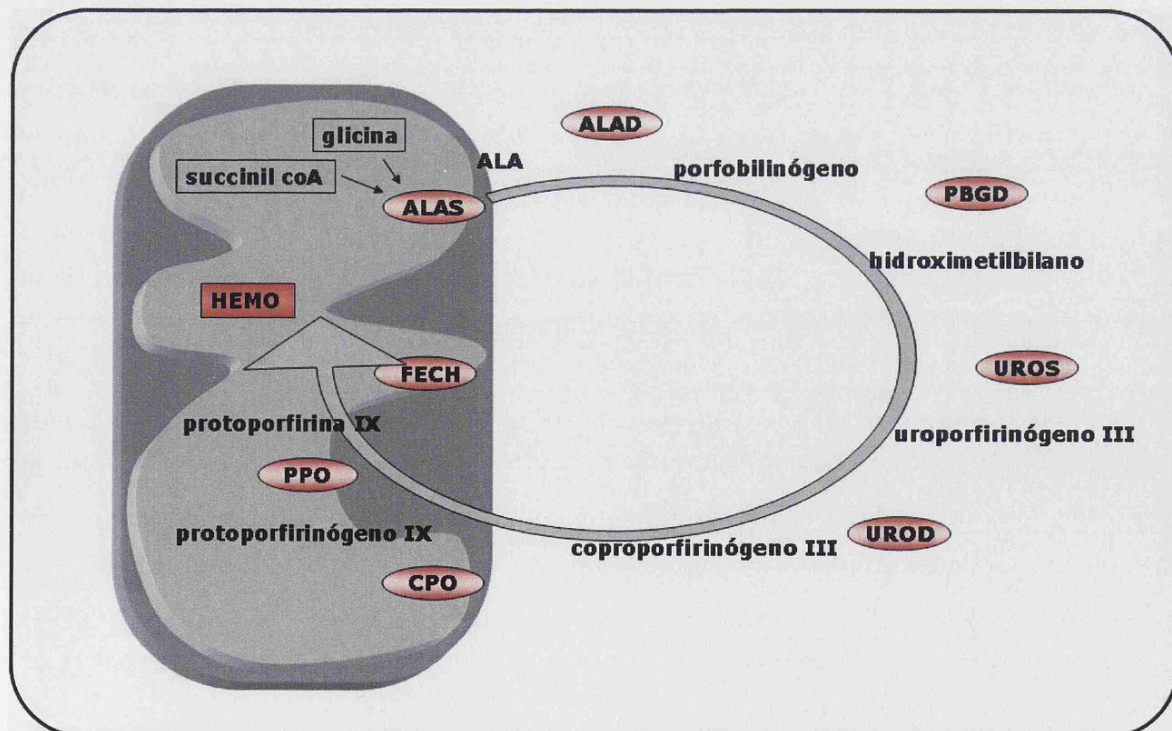


Figura 2. Ruta de biosíntesis del grupo hemo. La primera y las tres últimas enzimas son mitocondriales; el resto son citosólicas.

1. B.3 *Porfobilinógeno desaminasa*

La porfobilinógeno desaminasa, PBGD (EC.2.5.1.61), cataliza los pasos de desaminación y condensación de cuatro moléculas de PBG para obtener un tetrapirrol lineal intermediario muy inestable, el hidroximetilbilano (HMB). La enzima funciona como monómero y en humanos tiene un peso molecular de 35 a 40 kD. Contiene un cofactor dipirrolmetano en su sitio catalítico que está unido covalentemente a la enzima y sirve de anclaje a las moléculas de sustrato.

El gen de la PBGD en humanos se sitúa en el cromosoma 11 (11q23-11qter) y está constituido por 15 exones. Existen dos formas de PBGD, ubicua y específica de tejido eritroide, codificadas por dos ARNm diferentes. Estos dos ARNm se originan a partir de dos unidades de transcripción solapantes de un único gen. En el ARNm ubicuo el exón 1 se empalma con el exón 3 y el otro transcrito comienza en el exón 2 (Cretien y cols., 1988).

1. B.4 *Uroporfirinógeno III sintasa*

La cuarta enzima de la ruta, la uroporfirinógeno III sintasa, UROS (EC.4.2.1.75), es la responsable de una reorganización intramolecular y del cierre del anillo de HMB para formar uroporfirinógeno III, el intermediario fisiológico, un tetrapirrol cíclico con ocho cadenas laterales carboxílicas, cuatro radicales acetato y cuatro propionato. La ciclación no enzimática de HMB origina el isómero I del uroporfirinógeno (Jordan y cols., 1980), que carece de función biológica, aunque puede ser metabolizado hasta coproporfirinógeno I. La UROS es una proteína citosólica, monomérica, con un peso molecular aparente de 29,5 kDa.

El gen de la UROS está localizado en el cromosoma 10, entre las regiones 10c25.2 y 10q26.3 (Astrin y cols., 1991) y la constituyen 10 exones. El gen de la UROS presenta dos promotores alternativos que generan dos tipos de transcritos. En todos los tejidos se genera el transcrito ubicuario, compuesto por el exón 1 fusionado a la secuencia codificada desde el exón 2B al exón 10. En las células eritroides, además del anterior, encontramos el transcrito que contiene la región 2A del exón 2 fusionada al fragmento codificado desde el exón 2B al exón 10.

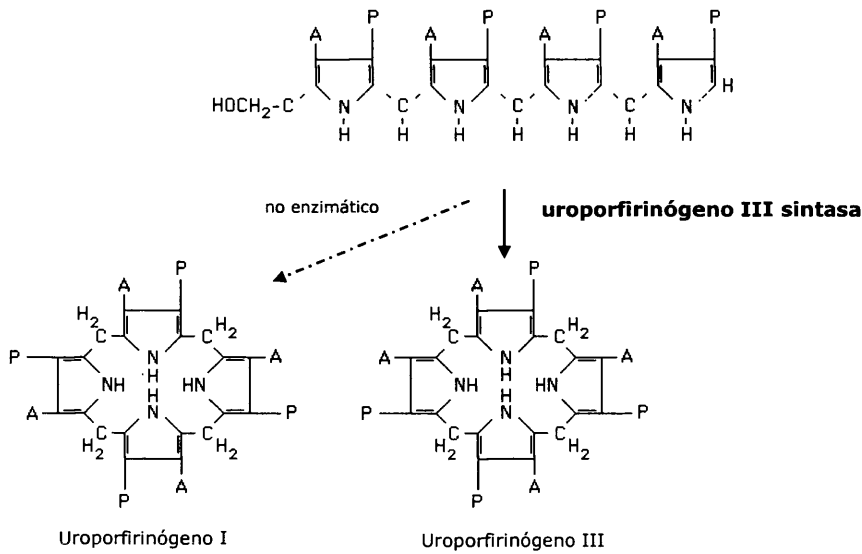


Figura 3. Ciclación enzimática y no enzimática de HMB.

1. B.5 Uroporfirinógeno descarboxilasa

La uroporfirinógeno descarboxilasa, UROD (EC.4.1.1.37), cataliza la descarboxilación secuencial de cuatro cadenas laterales de acetato del uroporfirinógeno III para obtener coproporfirinógeno III. La UROD funciona como dímero y sólo utiliza como sustrato los porfirinógenos, la forma reducida de las porfirinas. La actividad enzimática es inhibida por diferentes metales y compuestos que modifican los grupos sulfidrilos.

El gen que codifica para la UROD está situado en el cromosoma 1 en la región 1p34 (Dubart y cols., 1986) y se encuentra organizado en 10 exones. Tiene un único promotor, sin embargo, existen dos sitios de inicio de la transcripción que son usados en la misma proporción en células eritroides y no eritroides.

Las tres enzimas terminales de la ruta de síntesis del hemo están localizadas en la mitocondria en asociación con la membrana interna y su ubicación sugiere que estas enzimas podrían formar un complejo multienzimático a modo de canal para el sustrato. Parece que una de las funciones de estas enzimas es prevenir la acumulación excesiva de intermediarios de la ruta. También podría existir un canal o transportador para el hierro localizado próximo a la ferroquelatasa (Ponka, 1997).

1. B.6 *Coproporfinógeno oxidasa*

La coproporfinógeno oxidasa, CPO (EC.1.3.3.3), cataliza la descarboxilación oxidativa de los dos grupos propionato en las posiciones 2 y 4 del coproporfinógeno III a dos grupos vinilos para formar protoporfinógeno IX. La CPO está localizada en el espacio intermembrana de la mitocondria.

Se ha clonado el ADNc de la CPO humana. Existe un solo gen en la región 3q12 con múltiples sitios de activación de la transcripción y, aunque parece que sólo es activo un único promotor, estaría regulado diferencialmente en tejido eritroide y no eritroide. El gen de la CPO está compuesto por 7 exones y contiene dos sitios de poliadenilación; el uso alternativo de estas dos señales sería el responsable de la producción de ARNm de CPO con diferentes extremos 3' en distintos tejidos (Delfau-Larue y cols., 1994).

1. B.7 *Protoporfinógeno oxidasa*

La protoporfinógeno oxidasa, PPO (EC.1.3.3.4), cataliza el penúltimo paso de la ruta de síntesis del hemo, en el que seis átomos de hidrógeno son eliminados del anillo del porfirinógeno para oxidar el protoporfinógeno IX a protoporfirina IX. La PPO es una proteína integral de la membrana mitocondrial interna con el sitio activo dirigido al espacio intermembrana.

El gen de la PPO humana se localiza en el cromosoma 1q22-23 y está codificado por 13 exones. El producto de transcripción tiene un tamaño aproximado de 1.8 kb (Puy y cols., 1996). La inducción de la diferenciación eritroide está asociada con un incremento significativo en la actividad enzimática de la PPO.

1. B.8 *Ferroquelatasa*

El último paso enzimático de la síntesis del hemo es la inserción de hierro en el anillo de protoporfirina IX por la enzima ferroquelatasa (EC.4.99.1.1) (Dailey y Lascelles, 1974). A diferencia del resto de las enzimas de la ruta de síntesis del hemo, la ferroquelatasa utiliza como sustrato una porfirina, la forma oxidada del porfirinógeno. Esta enzima sólo puede incorporar ion ferroso por lo que es necesaria la reducción del ion férrico por otra enzima mitocondrial, la NADH-ferricianina reductasa. Posteriormente la ferroquelatasa se encarga de insertarlo en

la protoporfirina y formar grupo hemo. El gen de la ferroquelatasa está localizado en el cromosoma 18q21.3 y está codificado por 11 exones. De esta enzima se habla más detalladamente en el apartado 2.C.

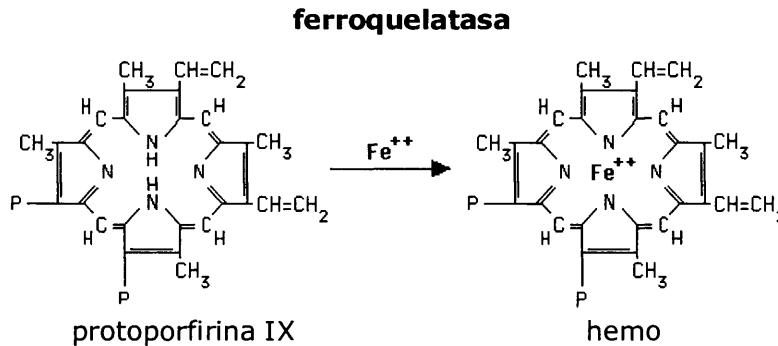


Figura 4. Inserción de hierro en la protoporfirina IX para formar hemo catalizada por la ferroquelatasa.

1. C Las porfirinas

1. C.1 Generalidades de las porfirinas

Las porfirinas son tetrapirroles cíclicos carentes de metal, productos intermediarios de la ruta de síntesis del hemo. Fueron descritas en 1930 por el premio Nobel Hans Fisher. Las porfirinas unidas a metales se convierten en grupos prostéticos de gran variedad de proteínas implicadas en diversos procesos vitales (Anderson y cols., 2001). En los mamíferos, unidas a hierro, constituyen hemoproteínas. En los organismos fotosintéticos la ruta metabólica de las porfirinas deriva hacia la síntesis de clorofilas y bacterioclorofilas y en bacterias hacia las corrinas; las primeras contienen magnesio y las segundas cobalto.

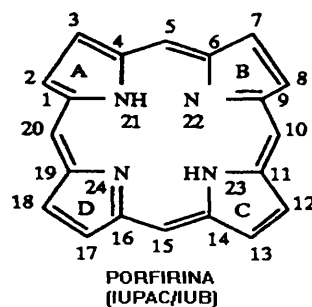


Figura 5. Estructura de las porfirinas. Sistema de numeración de la IUPAC/IUB.

La nomenclatura propuesta por Fisher para estas moléculas es la que se utiliza actualmente, aunque ha sido normalizada y uniformada por la Unión Internacional de Bioquímica (IUB) (IUPAC-IUB, *Joint Commission on Biochemical Nomenclature*(JCBN), 1980).

1. C.2 **Propiedades físicas y químicas de las porfirinas**

El núcleo básico de todas las porfirinas, la porfina, está formado por cuatro grupos pirrólicos unidos entre sí por puentes meténicos. La existencia de dobles enlaces conjugados da como resultado una estructura resonante y plana de gran estabilidad. La saturación o no de los puentes meténicos permite la existencia de dos estados de oxidación. Todos los tetrapirroles cíclicos intermediarios de la ruta biosintética del hemo, a excepción de la protoporfirina IX, son porfirinógenos, compuestos en estado reducido, no conjugados, incoloros y no fluorescentes (Smith, 1975).

Las porfirinas son el producto de oxidación de los porfirinógenos. Muestran un espectro de absorción de luz ultravioleta y visible característico que consiste en una banda principal cerca de los 400 nm, llamada banda de Soret, y cuatro bandas de absorción pequeñas entre los 500 y los 630 nm, que disminuyen en intensidad hacia las longitudes de onda rojas.

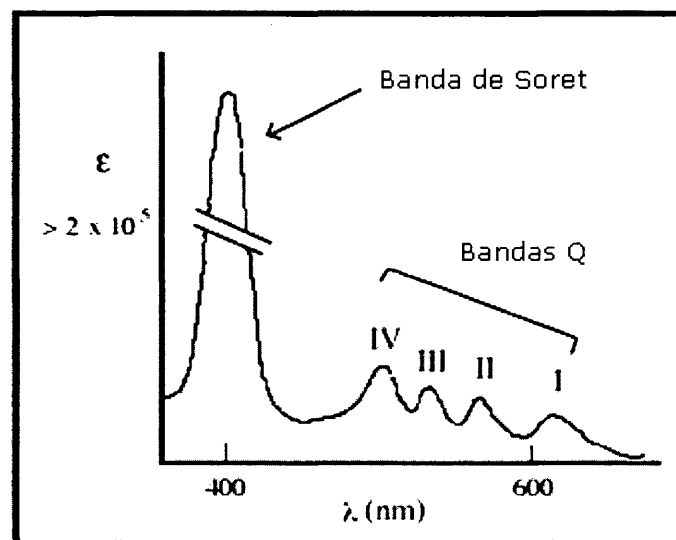


Figura 6. Espectro de absorción de una porfirina.

Las porfirinas emiten fluorescencia roja intensa cuando son expuestas a luz de longitud de onda en torno a 400 nm. Cuando se disuelven en ácido muestran dos fuertes bandas de emisión, una de 600 a 610 nm y otra de 640 a 660 nm. Las porfirinas queladas con metales diamagnéticos (Mg, Sn, Zn) conservan esta característica, que permite la detección y cuantificación de las porfirinas mediante métodos espectrofluorimétricos.

La solubilidad de las porfirinas en agua es favorecida por la presencia de cadenas laterales con ácidos carboxílicos libres y determina las rutas de excreción. La uroporfirina, octocarboxílica, se excreta exclusivamente por vía renal mientras que la protoporfirina, dicarboxílica y por tanto menos hidrosoluble, lo hace por ruta biliofecal. La coproporfirina, tetracarboxílica, utiliza ambas vías, si bien se elimina en mayor cuantía por ruta biliar; por esta dualidad excretoria, se aprecia coproporfinuria incrementada con disminución de la coproporfinorrea en situaciones colestáticas.

1. D Regulación de la síntesis del hemo

El ALA, el PBG y las porfirinas libres no tienen utilidad biológica en humanos y se producen generalmente como productos secundarios de la ruta de síntesis del hemo. Dicha ruta es muy eficiente, de forma que prácticamente la totalidad de intermediarios de porfirinas sintetizados se utilizan para formar el producto final (Ponka, 1997).

La síntesis del hemo tiene lugar mayoritariamente en las células eritroides en la médula, pero aproximadamente el 15% de la producción diaria ocurre en el hígado para la formación de las enzimas que contienen hemo. Los mecanismos reguladores que controlan la síntesis de hemo en estos dos órganos difieren. En el hígado, las enzimas de la síntesis del hemo tienen un recambio rápido que permite al hígado responder a los cambios en los requerimientos metabólicos. Sin embargo, en los progenitores eritroides la ruta está regulada de forma que sea posible un nivel de síntesis de hemo estable y su regulación está ligada a la disponibilidad de hierro (Ajioka y cols., 2006).

El ALA es el primer producto intermediario de la ruta y está destinado exclusivamente a la síntesis del hemo. La tasa de síntesis de ALA es un paso importante en la regulación de la formación de hemo, especialmente en el hígado.

La síntesis del hemo en el hígado y en las células eritroides está regulada en parte por distintos genes, uno constitutivo y otro específico eritroide, que codifican isozimas de ALAS, ALAS1 y ALAS2, respectivamente.

1. D.1 Regulación de la síntesis del hemo hepático

El 65% del ALA y hemo producidos en el hígado de rata es utilizado para la formación de las enzimas del citocromo P450 microsomal, aproximadamente el 15% para la síntesis de citocromos mitocondriales y el 25% para la síntesis de otras hemoproteínas, como la catalasa en los peroxisomas.

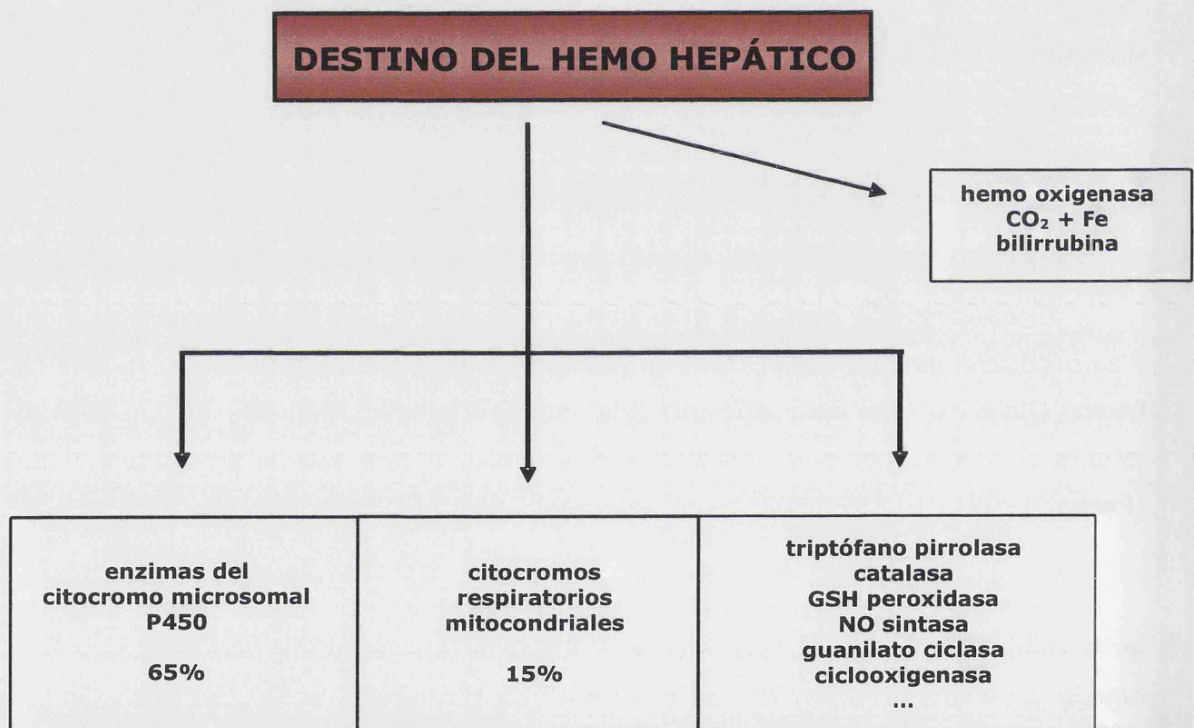


Figura 7. Destino del hemo hepático.

1. D.1.A Por la enzima reguladora: ALAS1

La ALAS1 funciona en el hígado como enzima limitante de la producción de hemo en ciertas condiciones. La actividad de la ALAS1 en un hígado normal es la

más baja de todas las actividades de las enzimas que intervienen en la síntesis del hemo (30- 100 nmol ALA/h/g hígado en ratón). La actividad de la PBGD, tercera enzima de la ruta, es parecida a la de la ALAS1; en situación de incremento en la necesidad de hemo en el hígado, la ALAS1 se induce, la producción del ALA se ve incrementada y la PBGD puede actuar como segundo paso metabólico limitante. La ferroquelatasa también tiene una actividad hepática baja (0.4 nmol hemo/mg proteína mitocondrial/minuto en hígado de rata), aunque muestra una actividad más alta que las de las enzimas ALAS1 y PBGD, por lo que es raro que actúe como paso limitante en el hígado. Las actividades del resto de las enzimas de la ruta son mayores que las de estas tres.

La función de la ALAS como enzima limitante o reguladora está determinada por el hecho de que su ARNm se incrementa rápidamente en condiciones fisiológicas de demanda de hemo, mientras que la expresión de otras enzimas de la ruta no se modifica sustancialmente.

La actividad basal de la ALAS1 hepática produce suficientes ALA y hemo para mantener las concentraciones normales de hemoproteínas hepáticas. Sin embargo, en condiciones en las que está incrementada la necesidad de hemo debido a una respuesta a señales exógenas, como la ingesta de fármacos, alcohol y otros xenobióticos, se induce la síntesis de las enzimas del citocromo P450 encargadas de su metabolización, y de igual forma, se induce la ALAS1 hepática para la producción del hemo prostético. Estudios recientes en humanos han demostrado que el incremento en la síntesis de la ALAS se produce por activación directa de la transcripción del gen de la ALAS1 por el fármaco. En este sentido, se han identificado "secuencias de respuesta a xenobióticos" en la región 5' de la ALAS y de numerosos citocromos. Estas secuencias son reconocidas por algunos tipos de receptores nucleares, concretamente el receptor de hormonas progestágenas, (PXR, *pregnane X receptor*) y el receptor de testosterona (CAR, *constitutive androstane receptor*). La unión de estos receptores nucleares a las secuencias de respuesta específicas induce la transcripción de dichos genes (Podvinec y cols., 2004).

1. D.1.B Por el producto final: hemo

La represión de la ALAS1 mediada por hemo, el producto final, contribuye a que esta enzima sea un paso limitante en la ruta de síntesis del hemo. El hemo generado en la mitocondria tiene diversos efectos reguladores sobre su propia

síntesis hepática; tanto a nivel de transcripción, al disminuir la vida media del ARNm de la ALAS1, como de la traducción, al reprimir el transporte de la proteína precursora de la ALAS1 desde el citosol a la mitocondria, pero no es suficiente para inhibir la actividad de esta enzima (Ponka, 1997).

El papel regulador del hemo respecto a su propia biosíntesis y catabolismo se explica asumiendo la existencia de reservas (*pool*) de hemo libre en los hepatocitos, que es aquél que ha sido sintetizado recientemente y todavía no se ha unido al grupo prostético de las hemoproteínas específicas o bien el que acaba de ser liberado de las hemoproteínas. Aunque no se ha comprobado su existencia, hay evidencias de que las reservas de hemo libre existen como entidades funcionales en las células hepáticas, manteniendo unas concentraciones de hemo adecuadas mediante una combinación de mecanismos de síntesis y degradación, a modo de mecanismo "sensor" que evaluaría los cambios en esta reserva de hemo libre (Ponka, 1997):

- El hemo libre en la mitocondria regularía la tasa de síntesis de citocromo oxidasa.
- El hemo libre citosólico reprimiría la tasa de síntesis de ALAS1, considerándose como una reserva de hemo regulador.
- El hemo libre microsomal regularía la actividad de la hemo-oxigenasa, enzima limitante en la degradación del hemo a pigmento biliar, además de servir como sustrato para dicha enzima, lo que podría influenciar en la concentración de hemo libre regulador en los hepatocitos.

1. D.2 Regulación de la síntesis del hemo en células eritroides

El 85% del contenido de hemo de un organismo es sintetizado en las células eritroides. La hemoglobina es la hemoproteína más abundante y contiene aproximadamente el 70% del hierro total de un adulto.

La regulación de la ruta de biosíntesis del hemo en las células eritroides tiene lugar durante la diferenciación celular. Al contrario de lo que ocurre en el hígado, el hemo no ejerce un control directo sobre su propia síntesis en las células eritroides sino que actúa regulando la síntesis de la cadena de globina para

incrementar la hemoglobina y equilibrar de este modo la producción de hemo. Y también, a diferencia de lo que ocurre en el hígado, la activación de la síntesis de hemo en las células eritroides está acompañada no sólo por un incremento en la isoforma eritroide de la ALAS, ALAS2, sino también por la inducción de otras enzimas de la ruta.

También la PBGD funciona como enzima reguladora de la ruta en los eritroblastos; su transcripción parece inducida durante la diferenciación eritroide regulada por el factor nuclear E2 (NF-E2) (Chenais y cols., 1997).

La ferroquelatasa, última enzima de la ruta de síntesis del grupo hemo, también puede tener un papel en el control de la tasa de formación del hemo en las células eritroides. La deficiencia de ferroquelatasa en la protoporfiria humana causa una acumulación de la protoporfirina casi exclusivamente en el tejido eritroide, a pesar de que la ferroquelatasa es deficiente en todos los demás tejidos de estos pacientes. Esto sugiere que la actividad de la ferroquelatasa, cuando es parcialmente deficiente, puede ser limitante en las células eritroides pero no en otros tejidos.

El ARNm de la ALAS2 contiene un elemento de respuesta a hierro (*iron-responsive element*, IRE) en su extremo 5', lo que implica que la traducción del ARNm de la ALAS eritroide depende de la disponibilidad de hierro. Su papel regulador está mediado por una proteína sensible al hierro (PSFe) que actúa como proteína represora o inductora, en función de la disponibilidad de hierro, y que interviene regulando la translocación del ARNm de la ALAS2 y aumentando la estabilidad del ARNm del receptor de transferrina (RTf). De esta forma, se puede decir que en las células eritroides el paso limitante para la síntesis de hemo no es la producción de ALA sino la adquisición de hierro celular desde la transferrina (Ponka, 1997).

1. D.3 Síntesis del hemo en células no eritroides

La regulación de la síntesis del hemo en otros tejidos no es muy conocida pero podría ser muy diferente de la regulación que tiene lugar en el hígado o en las células eritroides.

En tejidos no eritroides la forma de la ALA-S que se expresa es la ALAS1. Sin embargo, ciertos inductores potentes de ALAS1 en hígado no parecen aumentar su actividad en corazón, glándulas adrenales, testículos, cerebro o bazo de rata (Kappas y cols., 1995). Por el contrario, ciertas hormonas sí inducen la actividad de la ALAS de ciertos tejidos no hepáticos. La hormona adrenocorticotrópica incrementa la actividad de la ALAS en la glándula adrenal (Martini y cols., 1997), la gonadotropina lo hace en testículo (Tofilon y Piper, 1980) y la eritropoyetina en el bazo (Wada y cols., 1967).

1. E Catabolismo del hemo

Puesto que el hemo es el grupo prostético de numerosas enzimas con un papel importante en la transcripción, traducción y translocación proteica y en la diferenciación eritroide, su degradación también se encuentra estrictamente regulada. Aproximadamente un 20% del hemo libre se destruye de manera previa a su incorporación en las hemoproteínas (Chowdhury y cols., 1989). La destrucción de eritrocitos senescentes y la rotura de hemoproteínas (hemoglobina, citocromos, peroxidasas, catalasas, triptófano pirrolasa...) producen moléculas de hemo que también van a ser degradadas. La mayoría del hemo en mamíferos es utilizado para la proteína de transporte de oxígeno hemoglobina, de forma que se sintetiza en células eritroides y se degrada en el sistema retículo-endotelial del hígado y bazo, donde la actividad de la hemo oxigenasa es mayor, aunque en situaciones de hemólisis las células tubulares renales también pueden degradar hemoglobina (Schacter, 1988).

El hemo es degradado fundamentalmente por la actividad de la hemo oxigenasa en los microsomas hepáticos. La hemo oxigenasa (E.C.1.14.99.3) fue descrita por primera vez en 1969 como una oxigenasa microsomal hepática con función mixta (Tenhunen y cols., 1969). Se han identificado y clonado tres isozimas: una forma inducible, HO-1 y dos formas constitutivas, HO-2 y HO-3. HO-1 y HO-2 catalizan la misma reacción bioquímica, pero se diferencian en las tasas de reacción, en la estructura primaria, en el peso molecular y en la termoestabilidad (Maines, 1986).

Se consideran dos etapas en la degradación del hemo. En la primera existe una catálisis enzimática por la actividad de la hemo oxigenasa que requiere que un agente reductor, el NADPH, y el oxígeno actúen sobre el ion ferroso. En la segunda

etapa se produce la oxidación por el oxígeno molecular, proceso posiblemente no enzimático. La etapa limitante reguladora de la degradación del hemo es la catalizada por la hemo oxigenasa.

La degradación del hemo es la responsable de la síntesis de pigmentos biliares (biliverdina y bilirrubina), de la producción de hierro libre y de CO, segundo mensajero y molécula que modula numerosos procesos vasculares.

1. F Las porfirias

Las porfirias son enfermedades, tanto hereditarias como adquiridas, en las que las actividades de las enzimas de la ruta de biosíntesis del grupo hemo son parcial o casi totalmente deficientes. Como hemos señalado anteriormente, hay ocho enzimas implicadas en la síntesis del hemo y, a excepción de la primera enzima, la deficiencia enzimática en uno de los pasos tiene como consecuencia la acumulación en tejidos y una excesiva excreción de porfirinas y/o sus precursores. Mientras que el hemo tiene un papel biológico importante, las porfirinas y sus precursores no tienen ninguna utilidad, siendo además tóxicos y directamente responsables de la patología en cada una de las porfirias (Anderson y cols., 2001).

Las porfirias pueden ser clasificadas, dependiendo de la sintomatología, en cutáneas, agudas y mixtas. Otra clasificación alternativa es la que divide las porfirias en hepáticas y eritropoyéticas, dependiendo del tejido principal de expresión del defecto enzimático específico, aunque algunas muestran expresión solapada en distintos tejidos. Esto se debe al control específico de tejido al que está sometida la expresión génica de la ruta del hemo.

La deficiencia en la primera enzima, reguladora de la ruta de síntesis del hemo, en células de la línea eritroide, la ALAS2, da lugar a una enfermedad recesiva, la anemia sideroblástica asociada al cromosoma X (Cotter y cols., 1992).

La actividad deficiente de la segunda enzima de la ruta, la ALAD, origina, exclusivamente en homocigotos, una enfermedad hepática autosómica recesiva, la porfiria por déficit de ALA-D, porfiria de Doss o plumboporfiria (OMIM: 125270) (Doss y cols., 1979). Hasta el momento sólo hay siete casos descritos y sus manifestaciones clínicas son fundamentalmente neurológicas.

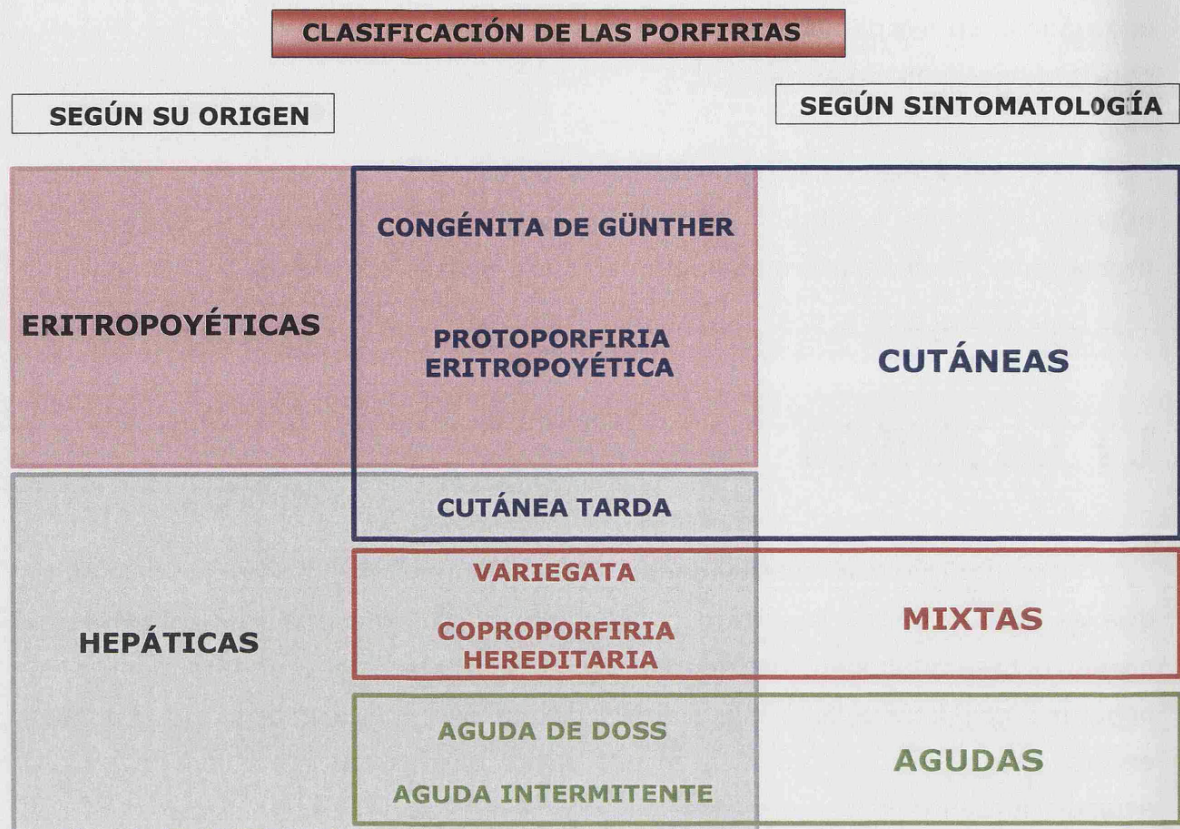


Figura 8. Clasificación de las porfirias según su origen y según su sintomatología.

La porfiria aguda intermitente (PAI, OMIM: 176000) es la porfiria hepática aguda más común. Es una enfermedad autosómica dominante resultante de una reducción de la actividad de la PBGD a la mitad. Esta enfermedad está caracterizada clínicamente por una variedad de síntomas abdomino-psíquico-neurológicos consecuencia de la disfunción de los sistemas nerviosos autónomo, periférico y central. Los síntomas son generalmente intermitentes y reversibles, aunque pueden poner en peligro la vida del paciente.

La porfiria congénita eritropoyética, o porfiria de Günther, (PCE, OMIM: 263700) es una enfermedad autosómica recesiva que resulta de una actividad muy deficiente de la UROS (Romeo y Levin, 1969). Se manifiesta por una marcada fotosensibilidad que da lugar a lesiones incluso mutilantes en partes expuestas al sol. En algunos casos se aprecia anemia hemolítica.

La porfiria cutánea tarda (PCT) y la porfiria hepatoeritropoyética (HEP) (OMIM: 176100) se deben a una deficiencia heterocigótica y homocigótica

respectivamente de la enzima citosólica UROD. La PCT es la porfiria más común y abarca tres grupos que no pueden distinguirse clínicamente: tipo I, esporádica; tipo II, familiar autosómica dominante, con mutación en el gen de la UROD y tipo III, familiar y sin mutaciones en el gen de la UROD. La HEP recuerda en sus manifestaciones clínicas a la porfiria congénita eritropoyética.

La coproporfiria hereditaria (CPH, OMIM: 121300) es una porfiria hepática autosómica dominante con manifestaciones neurológicas y/o dérmicas. Es secundaria a una deficiencia en la actividad de la enzima CPO (Elder y cols., 1976).

La porfiria variegata (PV, OMIM: 176200) es una porfiria hepática autosómica dominante debida a una deficiencia parcial en la actividad de la PPO. Esta porfiria recuerda en su sintomatología a la PAI y, al igual que la CPH, puede manifestarse con síntomas dérmicos; por esta dualidad clínica ambas porfirias son denominadas "mixtas".

Por último, la protoporfiria eritropoyética (PPE, OMIM: 177000) está causada por una deficiencia parcial en la actividad de la ferroquelatasa (Bottomley y cols., 1975); de sus características se tratará más detenidamente en el siguiente apartado.

PROTOPORFIRIA ERITROPOYÉTICA 2

2. A Definición y manifestaciones clínicas en la PPE

La PPE es una enfermedad causada por un defecto parcial en la actividad de la última enzima de la ruta biosintética del hemo, la ferroquelatasa, que cataliza la incorporación del hierro a la protoporfirina para sintetizar finalmente el grupo hemo (Bottomley y cols., 1975). La disminución en la actividad de la ferroquelatasa tiene como consecuencia una acumulación excesiva de un intermediario de la ruta, la protoporfirina IX, principalmente en las células eritroides de la médula ósea y también en plasma, en eritrocitos circulantes, bilis y heces.

A pesar de ser una de las porfirias más frecuentes, la segunda de las porfirias en orden de frecuencia después de la porfiria cutánea tarda, no se describió hasta 1961 (Magnus y cols., 1961), debido quizá a que las manifestaciones cutáneas son mayoritariamente leves y no hay una excreción excesiva de porfirinas en la orina (Anderson y cols., 2001) .

La PPE aparece como enfermedad pan-étnica, con una frecuencia estimada de 1 ó 2 casos por cada 10.000 habitantes. Se transmite de forma autosómica dominante, con penetrancia variable.

La PPE se manifiesta en dos vertientes clínicas: la afectación cutánea, cuya presencia es universal y definitoria de esta enfermedad y la afectación hepática, responsable de la mortalidad.

2. B Caracterización bioquímica de la PPE

En los pacientes con PPE la protoporfirina es el único intermediario de la ruta del hemo que se acumula de forma significativa y lo hace en forma libre y no unida a zinc. El diagnóstico se basa en la demostración de concentraciones incrementadas de protoporfirina en eritrocitos periféricos y plasma (Rimington y Cripps 1965). El barrido fluorimétrico del plasma diluido en PBS permite detectar la presencia de un pico característico de fluorescencia de la protoporfirina plasmática a 634 nm (Enríquez de Salamanca y cols., 1993).

La protoporfirina se excreta en la bilis y, con cierta frecuencia, está elevada en heces, aunque no es una característica invariable. Debido a que no se acumulan intermediarios de la ruta, las concentraciones de precursores y porfirinas en orina son normales, excepto en las últimas etapas de la enfermedad hepática, cuando se detecta un exceso de coproporfirina urinaria ligada a la colestasis.

2. C Ferroquelatasa

2. C.1 Introducción general

La ferroquelatasa (protohemo ferroliasa o hemo sintetasa) es la última enzima de la ruta biosintética del grupo hemo y está localizada en la membrana interna mitocondrial, orientada hacia la matriz, donde cataliza la inserción de hierro ferroso en la protoporfirina para formar hemo (Harbin y Dailey, 1985; Ferreira y cols., 1995).

Como muchas enzimas mitocondriales, la ferroquelatasa se sintetiza en el citosol en forma de un precursor de mayor tamaño que después es importado a la mitocondria (Camadro y cols., 1984; Dailey y cols., 2000). Cuando se ha expresado el ARNm de la ferroquelatasa murina en un sistema *ex vivo*, se sintetizó un polipéptido precursor de 43 kDa que se importó a las mitocondrias y posteriormente se procesó hasta la forma madura de la enzima (Karr y Dailey, 1988). Se ha especulado que la ferroquelatasa está asociada con el complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y que el ion ferroso podría ser producido por oxidación del NADH (Taketani y cols., 1986).

A diferencia de las tres enzimas anteriores de la ruta, que utilizan porfirinógenos como sustratos, la ferroquelatasa usa como sustrato la protoporfirina IX, forma oxidada del protoporfirinógeno IX. La ferroquelatasa sólo incorpora en la protoporfirina IX la forma reducida del hierro, Fe^{2+} , y no la forma Fe^{3+} (Porra y Jones, 1963; Anderson y cols., 2001).

2. C.2 Biogénesis, propiedades y estructura tridimensional de la ferroquelatasa

La ferroquelatasa murina es rica en lisina (11%) y en aminoácidos hidrofóbicos (48%) y su actividad es estimulada por la adicción de ácidos grasos e inhibida por metales como el cobalto, el zinc, el plomo, el cobre o el manganeso (Taketani y Tokunaga, 1981; Shipovskov y cols., 2005). Las membranas mitocondriales del hígado humano contienen una gran cantidad de metales endógenos, especialmente zinc, lo que puede influir en la actividad de la ferroquelatasa.

Se ha identificado un grupo ferro-sulfuroso [$2Fe-2S$] en la ferroquelatasa de ratón y humano. Esta región se localiza en el extremo C-terminal de la proteína, en una región de 30 residuos que contiene 4 residuos de cisteína localizados en una secuencia (C-X₇-C-X₂-C-X₄-C) y que funciona como un sitio de reconocimiento para el motivo [$2Fe-2S$] (Ta y Vickery, 1992). Se piensa que la presencia de esta secuencia [$2Fe-2S$] es esencial para la actividad de la enzima en mamíferos aunque no se conoce el papel exacto de este motivo en la reacción enzimática (Dailey y cols., 1994; Shi y Ferreira, 2004).

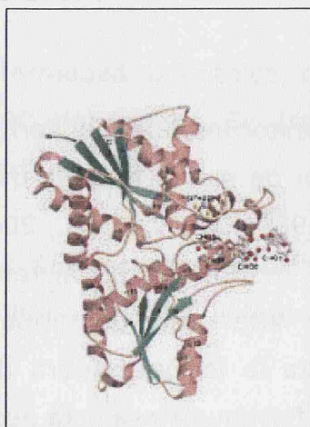


Figura 9. Estructura tridimensional de la ferroquelatasa humana. Wu y cols., 2001; Nature Structure Biology.

Se ha determinado la estructura cristalina de la ferroquelatasa humana por rayos X (Burden y cols., 1999); la enzima existe en forma de homodímero y el polipéptido está plegado en dos dominios similares, cada uno con cuatro láminas β paralelas flanqueadas por hélices α . Ambos dominios forman una hendidura enriquecida con varios residuos conservados y que son fundamentales para la catálisis; en esta hendidura existe un lazo cuyos residuos contactan con los anillos pirrólicos para estabilizar la unión con la porfirina y su orientación. Esta región está próxima al lugar donde la enzima se asocia a la membrana y es rico en residuos hidrofóbicos, lo que facilita la captura de la porfirina, insoluble en agua, proporcionando también un camino para la liberación del hemo (Shi y Ferreira, 2004). En esta hendidura se encuentra a su vez la His 183, implicada en la unión al hierro ferroso (Al-Karadaghi y cols., 1997).

2. C.3 *ADNc y gen de la ferroquelatasa*

El ADN codificante de la ferroquelatasa humana fue aislado por primera vez de una librería de ADNc de placenta (Nakahashi y cols., 1990). Tiene un marco de lectura abierto de 1269 pares de bases que codifica para una proteína de 423 aminoácidos, incluyendo una secuencia líder de 54 aminoácidos, de forma que la enzima madura tiene 369 aminoácidos. El único gen de la ferroquelatasa humana funcional tiene 45 kb aproximadamente y contiene 11 exones (Taketani y cols., 1992). El gen funcional se ha localizado en la región cromosómica 18q21.3 (Taketani y cols., 1992; Whitcombe y cols., 1991) y se ha mapeado un pseudo gen de la ferroquelatasa en el cromosoma 3 (Whitcombe y cols., 1994).

El gen de la ferroquelatasa presenta dos sitios de poliadenilación que producen dos ARNm de aproximadamente 1.6 kb y 2.5 kb, en células eritroides y no eritroides (Taketani y cols., 1992).

El análisis de la región promotora del gen funcional muestra una secuencia promotora simple con sitios de unión potenciales para Sp1, NF-E2 y GATA-1; sin embargo no se han encontrado sitios de unión típicos como secuencias TATA o CAAT. El sitio de iniciación para la transcripción del gen funcional se ha asignado a una adenina 89 pb antes del sitio ATG de iniciación de la traducción. El análisis del promotor del gen de la ferroquelatasa murina ha identificado sitios Sp1 localizados entre -37 y -32 pb para la expresión constitutiva y una región que contiene una

caja CACCC y una caja vecina GC que está implicada en la expresión eritroide inducible en células MEL (eritroleucemia murina) (Taketani y cols., 1999).

La comparación de la secuencia de aminoácidos de la ferroquelatasa de ratón y levaduras con la secuencia de humanos muestra una homología de 88% y 46% respectivamente.

2. D Genética molecular de la PPE

2. D.1 La ferroquelatasa en la PPE

La actividad de la ferroquelatasa es deficiente en médula ósea, reticulocitos, hígado, fibroblastos cultivados y leucocitos de pacientes con PPE. (Bottomley y cols., 1975; Bonkowsky y cols., 1975).

En biopsias de hígado de pacientes con PPE la actividad de la ferroquelatasa es del 15% al 25% respecto a la actividad normal, que es menor al 50% de actividad esperada si la PPE se heredara conforme a un patrón estrictamente autosómico dominante.

El análisis molecular de las mutaciones en el gen de la ferroquelatasa responsables de la PPE ha mostrado una gran heterogeneidad genética. Se han encontrado mutaciones de cambio de sentido, variaciones en los sitios potenciales de procesamiento y deleciones intragénicas grandes y pequeñas, así como posibles mutaciones sin sentido y una inserción. Dentro de estos defectos, las mutaciones más frecuentes son las que afectan a la reorganización de los exones (Human Gene Mutation Database: www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php).

2. D.2 Herencia de la PPE

El modo de herencia de la PPE no responde a un patrón de herencia estrictamente dominante o recesivo; se puede decir que es fundamentalmente autosómico dominante con penetrancia incompleta, aunque existen siete casos

documentados de herencia autosómica recesiva (Lamoril y cols., 1991; Sarkany y cols., 1994; Poh-Fitzpatrick y cols., 2002; Whatley y cols., 2004). En el tipo dominante de PPE aparecen distintos grados de deficiencia de la enzima en los distintos pacientes y en los portadores asintomáticos. Los pacientes sintomáticos suelen tener menos de un 50% de la actividad normal, mientras que los asintomáticos muestran aproximadamente el 50% de la actividad normal y mayores concentraciones de ARNm producidos por el alelo no mutado (Gouya y cols., 1999). La penetrancia incompleta y la expresión clínica variable sugieren la implicación conjunta de mutaciones deletéreas en la ferroquelatasa y de factores adicionales.

2. D.2.A Modulación de la expresión del gen de la ferroquelatasa

En la PPE existen pequeñas variaciones en la expresión del alelo normal en *trans* con el alelo mutado que pueden tener un impacto importante en la expresión clínica de la enfermedad. Así, la penetrancia de una mutación dominante puede ser modulada por polimorfismos funcionales en el mismo *locus*, disminuyendo la expresión génica por debajo de un umbral crítico, de forma que cuando la actividad enzimática de la ferroquelatasa cayera por debajo de dicho umbral, la acumulación de protoporfirina excedería la capacidad del hígado para eliminarla y esto llevaría a una manifestación clínica de la PPE (Gouya y cols., 2004). Gouya y colaboradores describieron en 1996 la existencia de un alelo de baja expresión que, junto con el alelo mutado en *trans*, sería responsable de la manifestación clínica de la enfermedad. Este alelo funcionaría más como un factor desencadenante que como un alelo deletéreo.

Además de los cambios genéticos, los cambios epigenéticos tales como la metilación de islas CpG participan en la regulación del silenciamiento de genes. La herencia epigenética del alelo de la ferroquelatasa normal metilado con baja expresión influiría también en la distinta penetrancia de la PPE. El estado de hipermetilación del promotor del gen de la ferroquelatasa indica la progresión de la PPE y podría ayudar a la determinación de un pronóstico (Onaga y cols., 2004).

2. E Alteraciones hematológicas en la PPE

La PPE cursa ocasionalmente con anemia leve con hipocromia y microcitosis o anemia leve con reticulocitosis. Sin embargo, en la mayoría de los casos no hay hemólisis o ésta es muy leve. Tampoco suele haber eritropoyesis dañada o metabolismo del hierro anormal, aunque el agotamiento de las reservas de hierro puede ser común, incluso en la ausencia de anemia (Turnbull y cols., 1973). Por otro lado, se ha observado acumulación de hierro en eritroblastos y en sideroblastos (Rademakers y cols., 1993).

Los reticulocitos de la médula ósea son la principal fuente de protoporfirina en exceso que se acumula en la PPE y que se excreta a través de la bilis y las heces (Brun y cols., 1996). Algunas veces el hígado puede ser una fuente de exceso de protoporfirina, pero no ha sido posible medir su contribución exacta (Nicholson y cols., 1973).

2. F Fotosensibilidad en la PPE

La fotosensibilidad cutánea puede estar presente desde los primeros años de la vida y es causada por la capacidad de fotoexcitación de la protoporfirina hasta un estado de triplete asociado cuando se expone a la luz solar, lo que favorece la formación de radicales libres de oxígeno que reaccionan con lípidos y proteínas de la membrana celular, determinando la pérdida de sus propiedades físico-químicas y la muerte celular. Clínicamente, la fotosensibilidad se manifiesta tras unos pocos minutos de exposición a la luz solar por el desarrollo de áreas de eritema, con prurito, quemazón o dolor, y edema, siendo raro el desarrollo de vesículas. En áreas repetidamente expuestas a la luz con el tiempo puede desarrollarse engrosamiento, especialmente sobre los nudillos, y liquenificación de la piel. En ocasiones aparecen surcos labiales y lesiones cicatrizantes en la región malar. Las manifestaciones tardías implican cambios pigmentarios con un incremento generalizado de la pigmentación (Schmidt y cols., 1974; Bopp y cols., 1980; Eales, 1980).

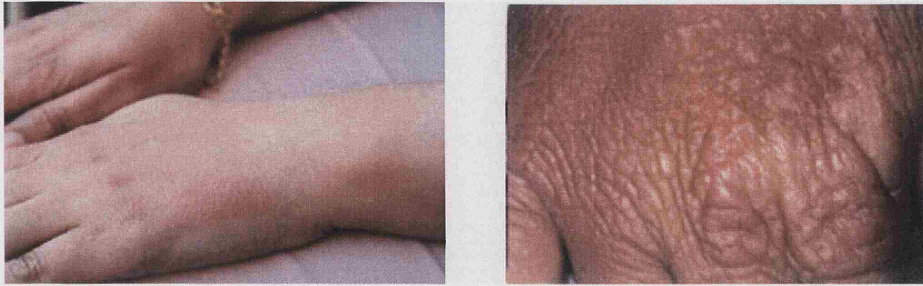


Figura 10. Ejemplo de lesiones cutáneas agudas y crónicas en pacientes con PPE.

2. F.1 Tratamiento de la fotosensibilidad

Para disminuir la fotosensibilidad asociada a esta enfermedad se debe evitar la exposición a la luz visible. La mayoría de los fotoprotectores comerciales no son útiles. Actualmente, el tratamiento para la PPE consiste en la prevención o disminución de la fotosensibilidad a través de la ingesta de β -caroteno. Sin embargo, este tratamiento no es efectivo en aproximadamente el 20% de los pacientes (Mathews-Roth y cols., 1977).

2. G Enfermedad hepática en la PPE

Las complicaciones hepatobiliares son una característica particular de esta porfiria, pero sólo aparecen en un número limitado de pacientes. La mayoría de los pacientes con PPE tiene una función hepática normal y el contenido en protoporfirina del hígado también suele ser normal. Únicamente el 20% de los pacientes presentan anomalías leves en los exámenes de función hepática y en torno al 5-10% de los pacientes desarrollan una enfermedad hepática grave como consecuencia de la progresiva acumulación hepática de protoporfirina (Libbrecht y cols., 2003).

La enfermedad hepática aparece comúnmente después de los 30 años de edad, aunque se puede observar en edades más tempranas. La presencia simultánea de algunos factores como hepatitis viral, abuso de alcohol, deficiencia de hierro, ayuno o anticonceptivos orales pueden alterar la función hepática o el

metabolismo del hemo y contribuir a la enfermedad hepática en algunos pacientes con PPE (Bonkovsky y Schned, 1986; Poh-Fitzpatrick y cols., 1986).

Inicialmente, el depósito de protoporfirina se debe a una síntesis o producción elevadas más que a una perturbación de su excreción biliar. Con el paso de los años, la protoporfirina se almacena como inclusiones cristalinas visibles en microscopía óptica, acelerando la lesión hepatocelular; la obstrucción de los conductos biliares de pequeño tamaño produce colestasis, lo que puede traducirse en el rápido desarrollo de una cirrosis hepática con aparición de hipertensión portal, ictericia e insuficiencia hepática; en estos casos es necesario realizar trasplante hepático (Libbrecht y cols., 2003). Aunque el desarrollo de ictericia marca habitualmente un punto de inflexión en la historia de la hepatopatía, ya que a partir de ese momento el paciente tiene una expectativa media de vida no superior a los tres meses y medio, el período de tiempo entre el diagnóstico de protoporfiria y el desarrollo de cirrosis hepática puede abarcar varios años. Clínicamente, la hepatopatía es habitualmente silente, incluso en la fase de cirrosis hepática establecida.

Los problemas hepáticos que amenazan la vida en la PPE están precedidos de forma característica por concentraciones elevadas de protoporfirina en eritrocitos y plasma, exámenes de función hepática anormales, depósitos de protoporfirina en las células hepáticas y en los canalículos biliares, colestasis y una fotosensibilidad incrementada (Rank y cols., 1993). La enfermedad puede entrar en una fase fulminante, donde el empeoramiento de la colestasis conduce a una acumulación de protoporfirina que en condiciones normales se excretaría a través del sistema biliar. Una concentración elevada de protoporfirina en sangre está asociada con un incremento de la hemólisis, agrandamiento del bazo y una carga elevada de protoporfirina que, por sí misma, agrava la enfermedad hepática: se establece un ciclo vicioso y la enfermedad avanza (Polson y cols., 1988).

La enfermedad hepática en su último estadio de progresión puede estar acompañada por neuropatía motora severa, con características que recuerdan a las vistas en las porfirias agudas (Rank y cols., 1993); en este momento el pronóstico es muy limitado y la principal solución es un trasplante de hígado (Polson y cols., 1988).

PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD HEPÁTICA

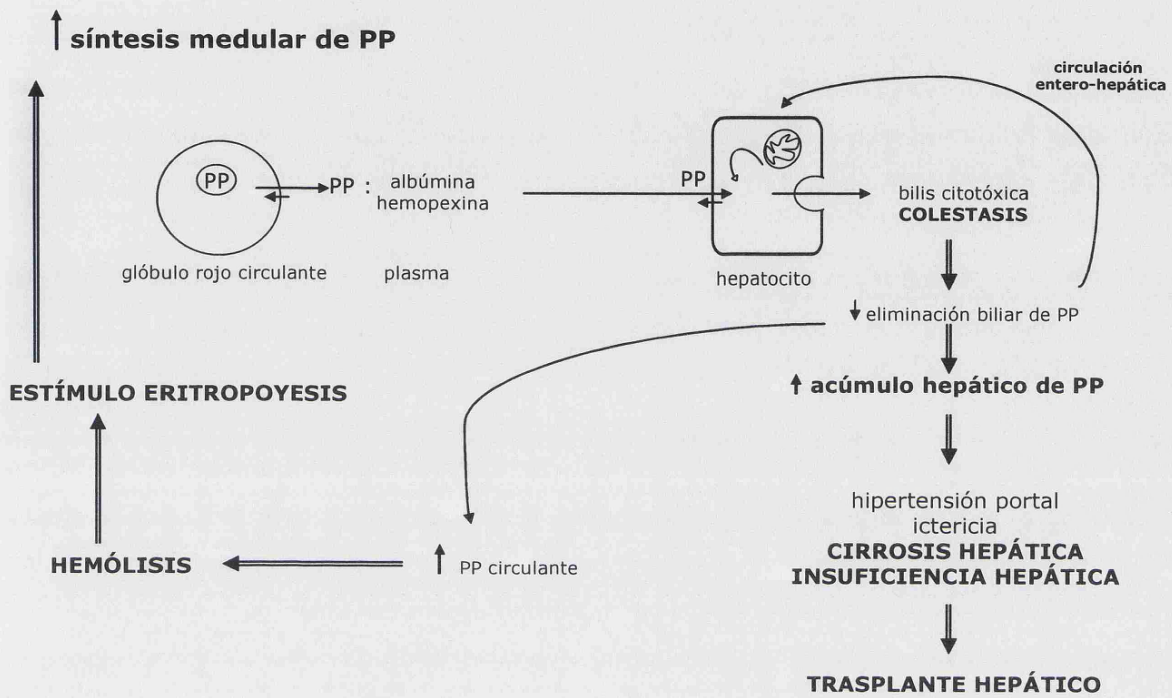


Figura 11. Esquema de la progresión de la enfermedad hepática en la PPE.

Investigaciones recientes han encontrado que, aunque las mutaciones específicas no podrían explicar el fenotipo grave por sí mismas, los pacientes con PPE con disfunción hepática grave y que precisan un trasplante hepático son portadores de una mutación de alelo nulo que resulta en la formación de una proteína truncada (Chen y cols., 2002). Puesto que no existe una relación clara entre el defecto genético y la acumulación de protoporfirina, la actividad enzimática residual o la severidad de la enfermedad, parece claro que existen otros factores que contribuyen a la expresión variable de la enfermedad (Gouya y cols., 2004), como se ha indicado previamente en el apartado de genética molecular.

2. G.1 *Papel de la protoporfirina en la enfermedad hepática*

En biopsias de hígado de pacientes con PPE con fallo hepático se observa protoporfirina depositada en los hepatocitos, macrófagos, canalículos biliares y los conductos biliares pequeños (Libbrecht y cols., 2003). En los casos más graves se observa cirrosis con depósitos de protoporfirina y de pigmentos biliares.

La protoporfirina es una molécula hidrofóbica que se excreta fundamentalmente a través del sistema biliar y es dudoso que exista circulación enterohepática de la misma. Su solubilidad en la bilis es crítica y podría explicar la aparición de frecuentes cálculos biliares en pacientes con PPE (De Leo y cols., 1976; Goerz y cols., 1976). La patogénesis de la enfermedad hepática en la PPE no está clara, pero una hipótesis sugiere que el daño hepático es causado por el efecto tóxico de la protoporfirina en la estructura y en la función del hígado al obstruir los canalículos biliares (Avner y cols., 1981; Morton y cols., 1988).

2. G.2 *Marcadores tumorales, citoquinas y enfermedad hepática*

A pesar de que no se ha descrito una elevada prevalencia de hepatocarcinoma en pacientes con PPE, las alteraciones en el metabolismo del hemo favorecen la transformación neoplásica en el hígado humano (Fracanzani y cols., 2001). La hepatocarcinogénesis en ratones protoporfíricos es un proceso a largo plazo que sólo lleva al desarrollo de hepatocarcinoma en una edad avanzada, por lo que es posible que los pacientes con daño hepático avanzado reciban un trasplante de hígado antes de que se desarrolle un hepatoma detectable (Libbrecht y cols., 2003).

La detección y cuantificación de los marcadores tumorales circulantes, producidos por las células tumorales o liberadas por el huésped, puede aportar información útil, que contribuye a establecer el diagnóstico, estadio y el pronóstico de determinados tumores; aunque ninguno de ellos, por sí mismo, puede utilizarse como diagnóstico definitivo en ausencia de una prueba histológica.

La alfafetoproteína (AFP) es una glucoproteína sintetizada en el hígado, saco vitelino y tracto gastrointestinal fetales, que se aclara rápidamente de la sangre poco después del nacimiento. Como marcador tumoral es útil en pacientes

diagnosticados de tumores de células germinales de origen testicular, extragonadal y ovárico, así como en el hepatocarcinoma. En este último caso la AFP se eleva en un 70-80% de los casos y los valores elevados se asocian con mayor extensión tumoral. Es el único marcador serológico ampliamente utilizado para el diagnóstico del carcinoma hepatocelular; sin embargo, la sensibilidad de este marcador es limitada (41-65%) y para realizar un diagnóstico se requiere medir más de un marcador (Filmus y Capurro, 2004).

CA19.9 es una glucoproteína mucinosa presente en la superficie celular que aparece elevada con mayor frecuencia en el cáncer de páncreas. Su sensibilidad es pequeña en tumores de escaso tamaño. Se ha descrito su utilidad para detectar colangiocarcinoma (Tangkijvanich y cols., 2004)

El hígado es el órgano central de la actividad de las citoquinas debido a que los hepatocitos son altamente susceptibles a su actividad en una serie de procesos fisiológicos y patofisiológicos, ya que tienen varios receptores para ellas (Ramadori y Armbrust, 2001). Además, las células no parenquimatosas del hígado, particularmente las células de Kupffer, macrófagos residentes en el hígado, sintetizan varias citoquinas que pueden actuar sistémicamente sobre cualquier otro órgano del cuerpo o de forma paracrina sobre los hepatocitos y otras células hepáticas no parenquimatosas. Entre ellas se encuentran citoquinas proinflamatorias como por ejemplo el factor de necrosis tumoral (TNF- α), citoquina multifuncional esencial para la regeneración normal del hígado; aumenta la síntesis de ADN y prepara a los hepatocitos para responder a factores de crecimiento como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Ramadori y Armbrust, 2001). HGF es una citoquina pleiotrópica con un fuerte efecto estimulador de la síntesis de ADN en los hepatocitos *in vitro* y en algunos experimentos se comporta como agente anti-fibrótico.

2. G.3 *Cadena respiratoria mitocondrial y enfermedad hepática en la PPE*

Las mitocondrias son orgánulos subcelulares donde ocurren diversas reacciones oxidativas, incluyendo la β -oxidación de ácidos grasos, la descarboxilación oxidativa de piruvato por el complejo de la piruvato deshidrogenasa y la oxidación de acetil-CoA por el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, para obtener energía. Este proceso se realiza a través de una serie de enzimas

conocidas como cadena respiratoria mitocondrial. En las reacciones oxidativas se generan cofactores reducidos, como las formas reducidas de FADH_2 y NADH , cuya re-oxidación se acopla a la formación de ATP en la cadena respiratoria mitocondrial; todo este proceso se denomina fosforilación oxidativa.

Todas las células nucleadas requieren hemo para la actividad funcional de los citocromos de la cadena respiratoria mitocondrial. La cadena respiratoria mitocondrial está compuesta por cinco complejos multiméricos; la energía liberada en este sistema es en parte utilizada por los complejos I, III y IV para generar un gradiente electroquímico que está acoplado a la síntesis de ATP a través de la ATP sirtasa. Debido a que el hemo es un grupo prostético fundamental para los citocromos mitocondriales, las anomalías en la ruta sintética del hemo causadas por una deficiencia en la ferroquelatasa, como ocurre en la PPE, pueden modificar la actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

Vijayasarathy observó que cuando inyectaba un inhibidor de la síntesis del hemo en ratones sanos, se apreciaba una disminución de las actividades del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial en hígado y cerebro (Vijayasarathy y cols., 1999). Existen trabajos en los que se ha descrito una asociación entre la acumulación de protoporfirina y los requerimientos intracelulares de ATP y las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria mitocondrial en el hígado, de forma que un incremento en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial podría dar cierto grado de protección contra el daño hepático en ratones con protoporfirina eritropoyética (Navarro y cols., 2005).

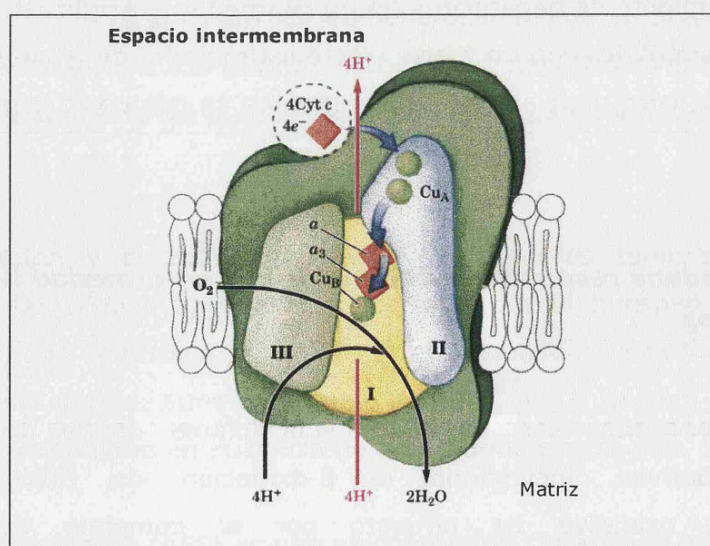


Figura 12. Complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial.

2. G.4 Tratamiento de la enfermedad hepática en la PPE

Para evitar la presunta recirculación enterohepática de la protoporfirina pueden emplearse colestiramina o carbón activado así como ácido ursodesoxicólico (AUCD) para facilitar la secreción biliar (Bloomer y cols., 1975; McCullough y cols., 1988; Rademakers y cols., 1990). En pacientes con cirrosis hepática establecida, con o sin fallo hepático, el único tratamiento efectivo es el trasplante hepático. En pacientes con fallo hepático avanzado en lista de espera para el trasplante hepático, la infusión de arginato-hemo o hematina para reducir la producción de protoporfirina y sus precursores en células eritroides inmaduras, o bien la realización de plasmaféresis para eliminar la protoporfirina libre, pueden mejorar, aunque de modo temporal y limitado, la situación general del paciente (Gardner y cols., 1991; Smith y Cox, 1997).

Es importante resaltar que el trasplante hepático no supone un tratamiento curativo, ya que la principal fuente de protoporfirina es el eritrón (Mathews-Roth, 1996), siendo responsable de la recidiva de la enfermedad en el nuevo hígado y, por lo tanto, un tratamiento definitivo implicaría también el trasplante de médula ósea o, en último extremo, la terapia génica dirigida a las células madre eritropoyéticas. Existen varios casos de trasplante alogénico de médula ósea para tratar leucemia en un paciente con PPE (Poh-Fitzpatrick y cols., 2002), como terapia para revertir la colestasis (Wahlin y cols., 2007) o en combinación con un trasplante hepático (Rand y cols., 2006). En los tres casos tras la intervención se observó una completa remisión del fenotipo protoporfírico.

Otras opciones terapéuticas, tales como el empleo de fármacos con capacidad supresora de la médula ósea, como la hidroxiurea, o bien la terapia génica dirigida a la corrección del déficit enzimático, podrían representar un medio de retardar la progresión de la enfermedad en el hígado donante o de curación de la enfermedad, respectivamente.



MODELOS ANIMALES DE PPE 3

Hasta el momento se han descrito varios modelos animales de PPE. Se ha caracterizado una deficiencia de la ferroquelatasa en terneros; los animales afectados desarrollan lesiones cutáneas tras la exposición al sol y presentan unas concentraciones de protoporfirina en eritrocitos y heces superiores a las descritas en pacientes pero, a diferencia de los humanos, no desarrollan anemia ni enfermedad hepatobiliar. La actividad de la ferroquelatasa está disminuida hasta un 50% en el hígado de los animales portadores mientras que los animales protoporfíricos sólo tienen un 10% de la actividad normal en hígado, riñón, corazón, bazo, pulmones y médula. La protoporfiria bovina se transmite de forma autosómica recesiva (Ruth y cols., 1977).

Childs y colaboradores describieron en el año 2000 un fenotipo mutante en el pez cebra con hemólisis y enfermedad hepática dependientes de luz, similar al observado en pacientes con PPE. Los embriones mutantes homocigotos drc (m248) presentaban una transversión G>T en un sitio donador de procesamiento de los intrones en el gen de la ferroquelatasa, creando un codón de terminación prematuro (Childs y cols., 2000).

De Matteis y Gibbs evidenciaron en 1975 la capacidad de la griseoflúvina y la isogriseoflúvina para inhibir la ferroquelatasa (De Matteis y cols., 1975). Con estos antifúngicos puede inducirse un fenotipo porfírico en ratones, de forma que este modelo inducido de porfiria ha sido objeto de varios estudios debido a que la concentración de protoporfirina eritrocitaria es comparable a la humana (Nakao y

cols., 1967). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en humanos, la protoporfirina acumulada tiene un origen hepático y no eritroide.

Recientemente, Magness y colaboradores han desarrollado un nuevo modelo de PPE caracterizado por una delección en el exón 10 de la ferroquelatasa (Magness y cols., 2002) y representa el primer modelo murino de herencia dominante de esta enfermedad. La mutación es letal en homocigosis, de manera que el estudio de la patología sólo se puede llevar a cabo en el animal heterocigoto. Éste presenta una actividad de la ferroquelatasa del 37% con respecto a la normal y desarrolla sensibilidad cutánea pero no desarrolla alteraciones hepáticas.

3. A Descripción del modelo murino de PPE ***Fech^{m1Pas}/Fech^{m1Pas}***

En 1991 Tutois y colaboradores describieron una deficiencia en la ferroquelatasa de ratón tras mutagénesis química con etilnitrosourea (Tutois y cols., 1991). La mutación observada tras la mutagénesis, M98K, se nombró "ferrochelatase deficiency" (*fch*) y producía una pronunciada disminución específica de la actividad enzimática residual de la ferroquelatasa, que es aproximadamente el 50% de la normal en heterocigotos y de 2.7% a 6.3% en homocigotos. Fue el primer modelo genético en ratón de la PPE humana, donde la patología se transmitía de forma autosómica recesiva y existía una disfunción hepática grave (Tutois y cols., 1991).

Los ratones *fch/fch* exhiben un incremento pronunciado de las concentraciones de protoporfirina en eritrocitos, plasma, hígado y heces; también presentan anemia hemolítica, con un aumento en el recuento de reticulocitos y fotosensibilidad, que se manifiesta en lesiones inflamatorias en las orejas y en la zona dorsal que frecuentemente derivan en úlceras.

Asimismo, presentan disfunción hepática grave, incluyendo fibrosis biliar e hiperplasia regenerativa con un marcado incremento en las concentraciones de bilirrubina conjugada, fosfatasa alcalina, aspartato amino-transferasa (AST) y alanino amino-transferasa (ALT), con ictericia desde los primeros días de vida, que mimetizan las características bioquímicas encontradas en las formas más graves de la PPE humana (Tutois y cols., 1991). Algunas áreas hepáticas están infiltradas por células mononucleares.

Se observan depósitos de protoporfirina en hepatocitos, canalículos biliares, macrófagos (lobulares y portales) y en el lumen de los conductos biliares pequeños, que ocasionan daño hepatocelular. Existe una correlación entre la cantidad de estos depósitos y la pérdida de funcionalidad en los lóbulos hepáticos, ya que los depósitos de protoporfirina, al obstruir y dañar una parte de los conductos biliares, provocan la propia retención de la protoporfirina en el parénquima (Libbrecht y cols., 2003).

El desarrollo de la enfermedad hepática está asociado con la formación de bilis con una alta concentración de protoporfirina y sales biliares y una concentración relativamente pequeña de lípidos (colesterol y fosfolípidos) y glucación, lo que podría causar citotoxicidad en el epitelio biliar. Esta toxicidad daña los colangiocitos y obstruye los conductos biliares pequeños, conduciendo a una posterior proliferación de las células de los conductos biliares que puede progresar a cirrosis biliar. Los cambios en la composición biliar en general son un factor importante en la iniciación de la enfermedad hepática biliar. Además, las diferencias entre individuos en el proceso de formación de la bilis, por ejemplo en procesos que regulan el metabolismo de las sales biliares o la secreción de lípidos biliares, podrían contribuir a la variabilidad en la manifestación de la enfermedad hepática relacionada con PPE (Meerman y cols., 1999).

Abitbol y colaboradores han desarrollado y caracterizado cepas congénitas en los fondos genéticos BALBC/cByJCrI, C57BL/6JCrI y SJL/JOrICrI para estudiar cómo cada fondo genético modifica los parámetros hematológicos y los fenotipos hepatobiliares de la mutación *fch/fch*. En este estudio se demuestra que existe un control genético independiente para la acumulación de protoporfirina en glóbulos rojos, para el aclaramiento de la protoporfirina y su acumulación por el hígado (Abitbol y cols., 2005).

TERAPIA CELULAR DE LA PPE **4**

4. A Antecedentes de terapia celular y terapia génica en el modelo murino de PPE

Hasta hace unos meses el ratón *fch/fch* era el único modelo murino disponible de porfirias eritropoyéticas y en él se han ensayado diversos protocolos de terapia génica en células de médula ósea con vectores retrovirales para corregir la enfermedad. Dado que no existe una ventaja selectiva de las células madre hematopoyéticas corregidas genéticamente, es imprescindible realizar una pre-selección de las células transducidas: en un caso se seleccionaron en base a la fluorescencia de la proteína verde fluorescente (E-GFP) (Pawliuk y cols., 1999) y en otros casos se seleccionaron por la pérdida de fluorescencia característica de las porfirinas en las células corregidas (Fontanellas y cols., 2001). Posteriormente, la transferencia génica con vectores lentivirales, más eficientes, permitió la transducción de un número suficiente de células madre hematopoyéticas, lo que obviaba el uso de un sistema de selección de células transducidas (Richard y cols., 2001). En estos estudios se obtuvo una corrección a largo plazo de la fotosensibilidad en los ratones PPE y de la actividad de la ferroquelatasa en la línea eritroide pero, aunque las concentraciones de protoporfirina disminuyeron en eritrocitos e hígado, no se consiguió una mejoría de la enfermedad hepática.

También se ha ensayado en el modelo murino de PPE un protocolo de terapia celular tras el que se comprobó que, cuando el trasplante de médula ósea se realizaba en ratones muy jóvenes, no sólo se corregía la fotosensibilidad y se normalizaban las tasas de protoporfirina, sino que también se prevenía la aparición de las complicaciones hepatobiliares derivadas de la enfermedad (Fontanellas y cols., 2000).

En un trabajo reciente Pawliuk y colaboradores demuestran que la protoporfirina producida por la médula ósea no es suficiente para causar la enfermedad hepática grave característica del modelo animal (Pawliuk y cols., 2005). Sin embargo, no parece ocurrir así en humanos, en los que existe un caso de PPE asociada a síndrome mielodisplásico en el que se ha descrito enfermedad hepática asociada a la sobreproducción de protoporfirina de origen exclusivamente medular, ya que la PPE era consecuencia de la expansión de un clon de células hematopoyéticas en la médula ósea en el que estaba delecionado un alelo de la ferroquelatasa (Goodwin y cols., 2006).

De cualquier modo, aún no se han comprendido completamente los mecanismos por los que la protoporfirina derivada de las células eritroides o del hígado contribuye a la fotosensibilidad y a la enfermedad hepática respectivamente.

4. B Terapia celular de la médula ósea en el modelo murino de PPE

El trasplante de médula ósea constituye en sí mismo un tratamiento establecido para determinadas enfermedades hematológicas. En la PPE, donde el defecto principal reside en la acumulación de porfirinas en médula ósea, cabe esperar que dicho trasplante mejore al menos la fotosensibilidad debida a dicha acumulación. Sin embargo, existe la posibilidad de que al realizar una terapia de la médula ósea se pudiera mejorar la condición del otro órgano dañado, el hígado. Esta mejoría del hígado no se debería únicamente a la disminución en el aporte de protoporfirina desde la médula ósea a la bilis para ser eliminada, sino al aporte que las células madre de médula ósea pudieran tener en la regeneración del órgano.

Actualmente el trasplante de hígado es una de las terapias más efectivas para las enfermedades hepáticas avanzadas, no obstante, el trasplante presenta problemas como la escasez de donantes, morbimortalidad quirúrgica, el rechazo y el alto coste. Una alternativa al trasplante de órgano sería la terapia celular con trasplante de hepatocitos, procedimiento mínimamente invasivo con menor número de complicaciones potenciales; sin embargo, en raras ocasiones ha producido un efecto terapéutico en ensayos clínicos (Fox y cols., 1998; Muraca y cols., 2002).

En los últimos años se están realizando numerosos estudios en el campo de la plasticidad de las células madre y su posible aplicación a la medicina regenerativa para restaurar la funcionalidad de los órganos dañados. Debido a las limitaciones indicadas anteriormente, empiezan a considerarse otras células como fuente de regeneración hepática, como las células de médula ósea, ya que se ha observado su capacidad para diferenciarse en células hepáticas, tanto *in vitro* como *in vivo* (Alison y cols., 2000; Theise y cols., 2000; Lagasse y cols., 2000).

Las células madre hematopoyéticas son las células madre mejor caracterizadas; su conocimiento ha permitido obtener injerto terapéutico en enfermedades hematológicas y por ello constituyen una gran promesa para las hemoglobinopatías y otras enfermedades genéticas cuyo fenotipo puede ser corregido en sangre o endotelio (Fang y cols., 2004).

La frecuencia de las células madre hematopoyéticas en la médula ósea es de 1 cada 10^4 ó 10^5 y se ha sugerido que, junto con los hepatocitos y las células madre hepáticas endógenas, son una fuente importante de reclutamiento para la regeneración hepática (Seo y cols., 2005).

Se ha obtenido una gran variabilidad de resultados en los estudios realizados, que se debe en gran medida a las características del modelo utilizado para el trasplante. Existen diversas variables que modifican las tasas de plasticidad celular: la naturaleza y extensión del daño en el tejido, el número de lesiones, la creación de quimerismo con irradiación inicial del receptor, la movilización previa de la médula ósea trasplantada y el fenotipo o estado funcional de las células infundidas (Quesenberry y cols., 2005).

Una complicación que surge en la interpretación de estos trabajos es la diferenciación de las células madre problema en otros tipos celulares que no son los deseados. Existen estudios en pacientes que recibieron un trasplante de médula ósea en los que las células trasplantadas se injertaron en el hígado inflamado y contribuyeron a cicatrizarlo y a la formación de cirrosis (Forbes y cols., 2004). También se ha descrito una contribución de miofibroblastos procedentes de la médula ósea a la formación de tumores estromales (Direkze y cols., 2004). En otros casos se ha visto que la activación de las células estrelladas hepáticas como consecuencia del trasplante de hepatocitos contribuye al injerto de las células trasplantadas (Benten y cols., 2005).

OBJETIVOS

El modelo murino de protoporfirina eritropoyética utilizado para este estudio presenta disfunción hepática grave debida a la excesiva acumulación de protoporfirina de origen fundamentalmente eritroide. La hepatopatía observada en estos animales incluye fibrosis portal y periportal, acumulación de protoporfirina en el parénquima hepático y conductos biliares, lisis de hepátocitos e hiperplasia regenerativa de las células del parénquima hepático. El trasplante de médula ósea de un ratón sano en este modelo murino reduce drásticamente la producción de protoporfirina eritroide, revierte parcialmente su acumulación en el hígado y permite iniciar el proceso de regeneración hepática.

Dado que las células madre de la médula ósea pueden ser reclutadas por el hígado y contribuir a la regeneración hepática con células sanas, nos planteamos la siguiente hipótesis nula:

Ho: no existe reclutamiento de células madre de médula ósea desde el hígado en condiciones de regeneración activa en los ratones con PPE después de recibir un trasplante de médula ósea sana.

Con el fin de resolver esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos en este trabajo:

1. Ensayar un protocolo de terapia celular mediante trasplante de médula ósea de ratones control en ratones *fch/fch*. Tras el trasplante, un grupo de animales será tratado con G-CSF para incrementar el número de células madre hematopoyéticas en la circulación sanguínea.
2. Analizar la capacidad de reclutamiento de células madre de médula ósea desde el hígado de los animales *fch/fch* y la posible diferenciación de estas células madre de médula ósea en células con funcionalidad hepática.
3. Estudiar la eficacia del trasplante de médula ósea control en la prevención y/o reversión de la enfermedad hepática en el modelo murino *fch/fch* a medio (3 meses post-trasplante) y largo plazo (9 meses post-trasplante).



MATERIALES Y MÉTODOS



ANIMALES 1

1. A Cría de ratones

Los ratones $Fech^{m1Pas}/Fech^{m1Pas}$ del fondo genético BALB/CJ están comercializados por el Laboratorio Jackson (número de stock: 002662, nombre de la cepa: BALB/c- $Fech^{m1Pas}/J$, Bar Harbor, ME). Se estableció una colonia en el animalario del Centro de Investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid.

El mantenimiento de los ratones se realizó en condiciones libres de patógenos con administración *ad libitum* de agua y bebida esterilizadas y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas.

Todos los animales de experimentación fueron tratados de acuerdo a las Directivas Europeas (86/609/CEE, 90/67/CEE, 99/575/CEE) y al Real Decreto 1201/2005 (B.O.E. del 21 de Octubre de 2005) sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

1. B Grupos experimentales

Para este estudio se realizaron trasplantes de médula ósea de ratones machos sanos (+/+) en ratones hembra con PPE (fch/fch). Tanto donantes como receptores tenían 2 meses de edad en el momento del trasplante.

Se establecieron 4 grupos de animales:

Grupo TC1 (grupo control). Trasplante de médula ósea de ratones machos sanos (+/+) en hembras sanas (+/+) (n=7). Los animales receptores se sacrificaron a los 5 meses de edad.

Grupo TC2. Trasplante de médula ósea de ratones machos sanos (+/+) en hembras con PPE (*fch/fch*) (n=5). Sacrificio de los animales receptores a los 5 meses de edad.

Grupo TC3. Trasplante de médula ósea de ratones machos sanos +/+ en hembras con PPE (*fch/fch*) (n=6) y tratamiento con factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Los animales receptores se sacrificaron a los 5 meses de edad.

Grupo TC4. Trasplante de médula ósea de ratones machos sanos +/+ en hembras protoporfíricas (*fch/fch*) (n=7). Los animales receptores fueron sacrificados a los 11 meses de edad.

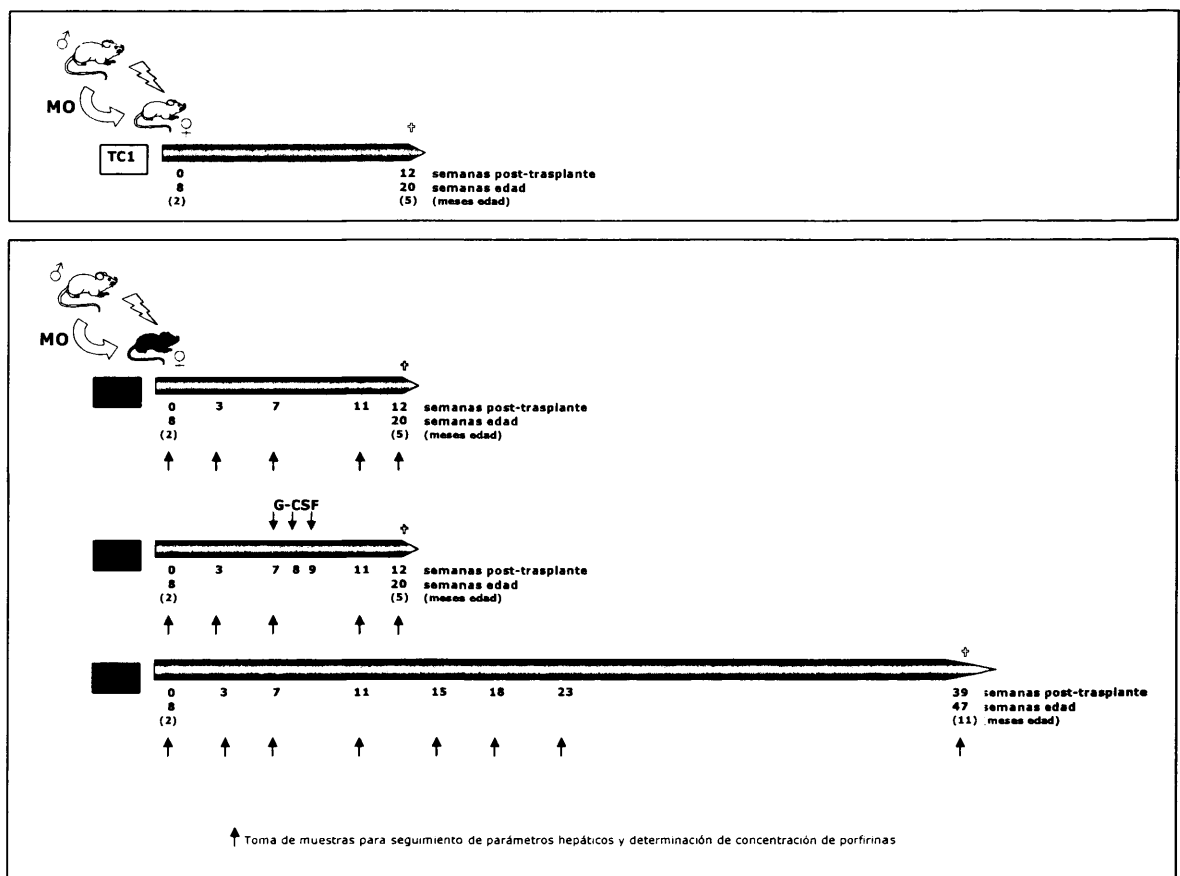


Figura 13. Grupos experimentales.

También se establecieron 4 grupos de animales control, que no habían recibido ningún tipo de tratamiento ni de trasplante:

- Animales $+/+$ de 4 meses de edad (n=6).
- Animales *fch/fch* de 4 meses de edad (n=6).
- Animales $+/+$ de 11 meses de edad (n=6).
- Animales *fch/fch* de 11 meses de edad (n=6).

PROCESADO DE MUESTRAS 2

2.A Sacrificio de animales

Los animales fueron inducidos por anestesia con halotano al 5% y se mantuvieron posteriormente con el anestésico al 1% ó 2%. En el momento de la punción cardíaca los animales fueron sacrificados por exanguinación.

2.B Extracción de muestras

2. B.1 *Sangre*

Las muestras de sangre se obtuvieron a partir del seno retro-orbitario del ratón anestesiado con un capilar heparinizado en el caso de la toma de muestras para el seguimiento de los animales trasplantados y por punción cardíaca en el caso de los animales que iban a ser sacrificados en ese momento. Para separar los eritrocitos y el plasma se centrifugó la sangre durante 5 minutos a 5000 r.p.m.

2. B.2 *Células de médula ósea*

Las células de médula ósea se obtuvieron a partir de fémur y tibia de los ratones por presión con 300 µl de tampón salino fosfato y posterior aspiración con una aguja de calibre 21 G (Becton Dickinson, Fraga, España) para disgregar la

médula ósea. Se lisaron los glóbulos rojos con solución de lisis (0,1 mM EDTA, 1 mM KHCO_3 y 0,17 M NH_4Cl) y se resuspendieron las células en medio Iscove con 10% de suero.

2. B.3 Hígado

Primeramente se realizó una hepatectomía parcial del lóbulo lateral izquierdo por ligadura en bloque de arteria y vena con una seda de 3/0. Este lóbulo se dividió en varios fragmentos, cada uno de los cuales se procesó de manera diferente:

- Para hacer el estudio histológico, hibridación *in situ* con sondas fluorescentes e inmunohistoquímica del hígado, se lavó un fragmento en PBS 1X frío (1,37 mM NaCl, 0,25 mM KCl, 0,43 mM Na_2HPO_4 , 0,14 mM KH_2PO_4), se fijó en formalina 4% y se incluyó en un bloque de parafina.
- Para realizar la hibridación *in situ* con sondas fluorescentes del hígado se embebió un fragmento en Tissue-Tek® (O.C.T.™ Compound. Sakura Finetek). Se conservó a -80°C hasta su procesamiento.
- Para el estudio de las actividades de la ferroquelatasa y del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial y para determinar las concentraciones de porfirinas y marcadores tumorales en hígado se congelaron cuatro fragmentos en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C .

MÉTODOS 3

3. A Genotipado de los ratones

Para realizar el genotipado de los ratones se extrajo el ADN genómico a partir de un fragmento de cola de ratón. Se digirió el tejido a 56° C en tampón de lisis con proteinasa K (250 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH=7,6, 5 mM EDTA, 1% SDS, 0,5 mg/ml proteinasa K) y se incubó 45 minutos con 20 µg/ml RNAsa a 37°C para eliminar el RNA.

Se separaron las proteínas con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se precipitó el ADN con isopropanol. Se lavó el precipitado de ADN con etanol 70% y el ADN se resuspendió en TE (10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA).

La concentración de ADN se valoró por espectrofotometría, de acuerdo con la relación 1 unidad de D.O. a 260 nm de ADN de doble hélice: 50 µg/ml.

El genotipo de los ratones se determinó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN genómico y el polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLPs) descrito por Boulechfar en 1993.

Los oligonucleótidos utilizados son: sentido 5'-TAA ACA TGG GAG GCC CTG AAA C-3' y antisentido 5'-GAC ACT TCC CAT TCA AAA TA-3', que originan un fragmento de 96 pb.

Las condiciones de PCR fueron: 4 minutos a 95°C; 30 ciclos de hibridación con 15 segundos a 94°C, 40 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C cada ciclo; elongación durante 1 minuto a 72°C.

Para realizar el análisis de restricción se empleó la enzima BspH I (Pag I) (Fermentas), que reconoce la diana:

5'.....T/CATGA.....3'

3'.....AGTAC/T.....5'

El análisis se realizó en geles de agarosa al 4% en TBE (50 mM Tris base, 50 mM H₃BO₃, 2,5 mM EDTA). La mutación produce un cambio en la secuencia de manera que la enzima no reconoce el sitio de restricción. De esta forma y según el genotipo de los ratones podemos obtener:

- En los ratones control (+/+) donde la enzima BSpH I corta con normalidad, un fragmento de 76 pb y otro de 20 pb.
- En los ratones heterocigotos (+/-), el fragmento correspondiente al alelo mutado de 96 pb y los dos fragmentos resultantes de la digestión normal, 76 pb y 20 pb.
- En los ratones homocigotos para la mutación (*fch/fch*) un único fragmento de 96 pb.

3. B Trasplante de médula ósea

3. B.1 Irradiación de los animales receptores

Los animales que recibieron el trasplante de médula ósea fueron irradiados previamente con 2 dosis de 4,75 Gy a 300 kV y 12,8 mA con una tasa de dosis de 1,03 Gy/min en 2 días consecutivos con un equipo de rayos Philips MG324X (Philips, Hamburg, Alemania) en la División de Hematopoyesis del C.I.E.M.A.T.

3. B.2 *Trasplante de médula ósea*

Se extrajeron las células de médula ósea de fémures y tibias de los ratones machos donantes según el método descrito anteriormente. El trasplante se realizó inyectando 10^7 células nucleadas de médula ósea total en una vena lateral de la cola de los ratones receptores hembras con ayuda de un cepo inmovilizador.

3. B.3 *Tratamientos*

El grupo 3 recibió un tratamiento con factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) para aumentar el número de células hematopoyéticas progenitoras circulantes. El tratamiento consistió en la administración subcutánea de 50 μ g G-CSF/ ratón (Neulasta, Amgen, Breda, Holanda) en PBS con 0,1% BSA (bovine serum albumin) una vez por semana durante 3 semanas. Los ratones se sacrificaron 3 semanas después de la última inyección.

3. C Bioquímica

3. C.1 *Determinación de las concentraciones de porfirinas*

En sangre

La concentración de protoporfirina en glóbulos rojos y plasma se valoró siguiendo el método descrito por Piomelli en 1977. Las porfirinas fueron medidas fluorimétricamente (Shimadzu RF-1501, Alemania) con una longitud de onda de excitación de 407 nm y 595 nm de emisión tras una doble extracción: la primera con acetato de etilo/ácido acético (4:1, v/v) y la segunda con ácido clorhídrico 1,5 N. La cuantificación se llevó a cabo frente a un estándar de URO en HCl 1,5 N de concentración conocida aplicando un factor de corrección.

En hígado

La fracción post-mitocondrial se obtuvo tras homogeneizar un fragmento de hígado en KCl 1,15% y centrifugar a 12000 r.p.m. durante 20 minutos. A partir del sobrenadante se extrajeron las porfirinas con el solvente metanol/ácido perclórico 1

M (1:1, v/v) y una centrifugación posterior de 10 minutos a 12000 r.p.m (Grandchamp, 1980).

En este sobrenadante se realizó la cuantificación de protoporfirina mediante fluorimetría (Shimadzu RF-1501, Alemania). Las muestras se midieron con una longitud de onda de excitación de 407 nm y a un máximo de emisión de 605 nm, valoradas frente a un patrón de URO en HCl 1,5 N. La concentración de protoporfirina en hígado se expresó como nmol/g de proteína.

3. C.2 *Determinación de parámetros hematológicos*

Los parámetros hematológicos (eritrocitos, hemoglobina, hematocrito y volumen corpuscular medio) se determinaron mediante métodos estandarizados en un autoanalizador Technicon H-11 System.

La concentración de porfirinas en glóbulos rojos fue referida a la cantidad de hemoglobina; en este caso la hemoglobina se determinó por espectrofotometría a 540 nm utilizando el reactivo de Drabkins (Sigma Diagnostics) y como estándar hemoglobina de concentración conocida.

3. C.3 *Determinación de parámetros séricos de función hepática*

Los parámetros bioquímicos del plasma (bilirrubina total, fosfatasa alcalina, aspartato transaminasa y alanina transaminasa) se determinaron mediante métodos estandarizados (Beckman Synchron CX7, Beckman Instruments, Brea, California) en el Laboratorio Central de Bioquímica del Hospital Universitario 12 de Octubre.

3. C.4 *Determinación de la actividad enzimática de la ferroquelatasa*

La determinación de la actividad enzimática de la ferroquelatasa en hígado se realizó según el método descrito por Camadro y Labbe en 1988, consistente en la medida fluorimétrica de la cantidad de protoporfirina-zinc formada tras la incubación de homogenado de hígado en presencia de zinc y protoporfirina.

El tejido se homogeneizó en un homogeneizador manual de cristal con 250 mM Tris-HCl pH=7,6 y 20% glicerol. Se centrifugó a 4°C, 11.000 r.p.m. durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante.

El extracto enzimático se incubó en 100 mM Tris pH=7,6, 1 mM ácido palmítico, 0,3 mg/ml Tween 80, 1% tritón y en presencia de 1 µM protoporfirina y 5 µM sulfato de zinc durante 1 hora a 37°C y en oscuridad. La reacción se paró con DMSO:metanol (30:70), 5 mM EDTA .

La lectura fluorimétrica se realizó a una longitud de onda de excitación de 420 nm y de emisión de 587 nm en un espectrofluorímetro Shimadzu RF-1501 (Alemania). Para estimar la concentración del producto se utilizó un estándar de protoporfirina-zinc de concentración conocida. La actividad se expresó en nmoles de protoporfirina-zinc formada por hora y por mg de proteína (U/mg).

3. C.5 *Determinación de la actividad de la citocromo C oxidasa*

El hígado se homogeneizó manualmente en tampón 20 mM fosfato potásico pH 7,4. La valoración de la actividad del complejo mitocondrial IV se llevó a cabo según el método descrito por Rickwood y colaboradores en 1987. Se midió la oxidación del citocromo c reducido en tampón 10 mM fosfato potásico pH 7,0 y 80 µM citocromo reducido a una longitud de onda de 550 nm y 38°C. Se utilizó un espectrofotómetro DU-650 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, EEUU).

La actividad de la citrato sintasa (CS) se evaluó espectrofluorimétricamente con una longitud de onda de 420 nm en 75 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 µM DTNB, 350 µg /mL acetyl Co A, 0,5 mM oxalacetato y 0,1% tritón X-100. La enzima CS de la matriz mitocondrial está considerada un marcador del volumen mitocondrial, por lo que la actividad del complejo IV se refirió a la actividad de la CS para corregir por el volumen mitocondrial (Zeviani y cols., 1991).

3. C.6 *Determinación de las concentraciones de marcadores tumorales en homogenados de hígado*

Los hígados se homogeneizaron en PBS modificado con homogeneizadores de cristal manuales. Las concentraciones de CA19.9, TNF- α y HGF se determinaron mediante la técnica de ELISA validada para homogenados de tejidos. Los ensayos utilizados fueron *CA19-9 radioimmunoassay* (FDI Fujirebio Diagnostics, Inc.) para CA19-9, *Quantikine[®] Mouse TNF- α Immunoassay* (R&D Systems) para TNF- α y *Quantikine[®] Human HGF Immunoassay* (R&D Systems) para HGF. La concentración de AFP se determinó mediante radioinmunoanálisis (RIA) en el laboratorio de Medicina Nuclear del Hospital Universitario 12 de Octubre.

En todos los casos los resultados se refirieron a la cantidad de proteína en el homogeneizado.

3. C.7 *Cuantificación de proteínas*

La concentración de porfirinas, la actividad enzimática de la ferroquelatasa, la actividad del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial y las concentraciones de marcadores tumorales en hígado fueron referidas a la cantidad de proteína existente en el homogeneizado donde se realizó el ensayo.

La concentración de proteínas en los homogeneizados se calculó mediante el método colorimétrico de Bradford (Bradford y cols., 1976). Para ello se utilizó el *Bio-Rad Protein Assay* (BIO RAD) y albúmina de concentración conocida como estándar.

3. D Histología

Para el estudio histológico se fijaron los hígados en formalina 4% y se incluyeron en bloques de parafina.

Se realizaron varias tinciones: una sección se tiñó con hematoxilina-eosina para estudiar la estructura del tejido, se realizó una tinción tricrómica de Masson

para localizar tejido conectivo (fibrosis) y una tinción de Perls para localizar posibles depósitos de hierro.

Los cortes se analizaron en un microscopio Axioplan 2 Imaging (Zeiss).

3. D.1 Inmunohistoquímica

Los marcajes con diversos anticuerpos para identificar los tipos celulares que observábamos en el hígado se realizaron en cortes de 5 μm de hígado incluido en parafina.

Los cortes se desparafinizaron mediante un precalentamiento a 70°C durante 10 minutos seguido de dos incubaciones de 10 minutos cada una en xileno a temperatura ambiente. Se hidrataron los cortes y se bloquearon durante 30 minutos con una solución de bloqueo consistente en 2% leche en PBS 1x. Las incubaciones se realizaron a 37°C durante 1 hora. Este protocolo se siguió con todos los anticuerpos excepto para el marcaje con anti-citoqueratina 19.

Tras sucesivos lavados en 1x PBS a temperatura ambiente, se realizó una contratinción con DAPI y se montaron con Vectashield.

Para identificar el fenotipo de hepatocito se marcó con un anticuerpo primario policlonal anti-albúmina murina en oveja (Biogenesis Ltd., Reino Unido); como secundario se utilizó un anticuerpo anti-IgG de oveja en burro marcado con Alexa Fluor® 594 (Invitrogen. Molecular Probes Inc., Madrid, España). Las diluciones fueron 1:100 y 1:250, respectivamente.

Un anticuerpo monoclonal anti- α actina de músculo liso (α - *smooth muscle actin*, α -sma) purificado de ratón, clon 1A4, conjugado con cianina 3 (Cy3) (Sigma; Saint Louis, Missouri, EEUU) sirvió para identificar miofibroblastos. La dilución de trabajo fue 1:100.

Para identificar células hematopoyéticas se utilizó un anticuerpo anti-CD45 murino en rata (AbD Serotec, Bionova Científica S.L., Madrid, España); como secundario se utilizó un anticuerpo anti-IgG de rata desarrollado en conejo y conjugado con Cy3 (Sigma; Saint Louis, Missouri, EEUU). Las diluciones empleadas fueron 1:100 y 1:600, respectivamente.

Para identificar células ovas se utilizó un anticuerpo anti- citoqueratina 19 murina policlonal desarrollado en conejo (Novus Biologicals, Bionova Científica S.L., Madrid, España); como secundario se utilizó un anticuerpo anti-IgG de conejo desarrollado en burro, conjugado con Alexa Fluor® 594 (Invitrogen. Molecular Probes Inc., Madrid, España). Las diluciones empleadas fueron 1:50 y 1:100, respectivamente y la incubación en el caso del anticuerpo primario fue de 2 horas a 37°C. En este marcaje se digirió el tejido con 0,3% de pepsina en Tris 10mM durante 30 minutos a 37°C antes de realizar el bloqueo. Se bloqueó con 2% de leche, 1% BSA y 0,05% Tween 20 en PBS 1x durante 30 minutos a temperatura ambiente.

3. D.2 *Hibridación 'in situ' con sondas fluorescentes*

Hibridación *in situ* en células de médula ósea

Las células de médula ósea se prepararon en PBS a una concentración de 150 000- 200 000 células/ ml. Se depositaron gotas de 100 µl aproximadamente en portas polilisinizados y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Se fijaron las células en metanol:acético (3:1) durante 30 minutos a -20°C. Se deshidrataron en alcoholes a 4°C y se desnaturalizaron en formamida al 70% /2x SSC durante 2 minutos a 65°C.

Se utilizó una sonda que reconocía el cromosoma Y murino marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Cambio Ltd, UK). La sonda diluída 5 veces con tampón de hibridación se desnaturalizó durante 10 minutos a 65°C. Las muestras se incubaron preservadas de la luz entre 18 y 20 horas a 37°C en una cámara húmeda.

Se realizaron sucesivos lavados a 42°C: 3 lavados en formamida 50%/1x SSC, 3 lavados en 1x SSC y un lavado en 0,05% Tween 20/4x SSC.

Por último, se realizó una contratinción con 4',6-Diamidino-2-phenyindole (DAPI) y se montó con Vectashield (Vector Laboratorios, Inc.).

Hibridación *in situ* en preparaciones histológicas de hígado

Cortes en criostato:

Los hígados se procesaron en un criostato Leica Cm 1510-1 (Leica Microsystems, Alemania); se realizaron cortes de 5 μm y se colocaron en portas polilisinazados.

Primeramente se fijó el tejido durante 30 minutos en paraformaldehído al 4%/2x PBS. Los cortes se desnaturalizaron en tiocianato sódico 8% pH=7-7,5 a 80°C durante 10 minutos. Se digirieron con 0,3% pepsina/ 10 mM HCl durante 15 minutos a 37°C. Se neutralizó la pepsina en solución de 0,2% glicina a temperatura ambiente y se fijaron los tejidos con 4% paraformaldehído/2x PBS durante 2 minutos. Se deshidrataron con alcoholes y se secó el tejido a temperatura ambiente.

La sonda, específica para cromosoma Y murino marcada con FITC, se diluyó 10 veces con tampón de hibridación (Cambio Ltd, Reino Unido) y se desnaturalizó durante 5 minutos a 65°C. Una vez aplicada la sonda sobre los cortes histológicos se desnaturalizó de nuevo junto con el tejido durante 5 minutos a 65°C. Las muestras se incubaron preservadas de la luz durante 18-20 horas a 42°C en una cámara húmeda.

Se realizaron sucesivos lavados a 46°C: 3 lavados con 50%formamida/2x SSC, 3 lavados con 2x SSC y un lavado con 0,01% tween 20/4x SSC y otros 3 lavados a temperatura ambiente en PBS. Se realizó una contratinción con DAPI y se montó con Vectashield.

Las secciones de hígado cortadas con criostato e hibridadas con sondas fluorescentes se emplearon para realizar un primer conteo de células de origen donante en hígado.

Cortes en parafina:

También se utilizó la técnica de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes en secciones de hígado en las que ya se había realizado marcajes con anticuerpos específicos de distintos tipos celulares. En este caso se utilizaron muestras de

hígado incluido en parafina y la técnica FISH fue diferente a la realizada en cortes de hígado congelados y procesados en criostato.

Los bloques de parafina que contenían el hígado de los ratones se cortaron en secciones de 5 μm en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Los cortes de hígado, tras ser incubados con los anticuerpos específicos respectivos y realizada la captura de imágenes, se incubaron en 2x SSC a 95°C durante 10 minutos. Se digirieron con 0,3% de pepsina en Tris 10mM durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda y se neutralizó el pH ácido de la pepsina en glicina 0,2%/2x PBS; únicamente en los cortes que habían sido incubados con anti-citoqueratina 19 no se realizó la digestión con pepsina. Los cortes se deshidrataron y se incubaron con la sonda diluida 10 veces durante 10 minutos a 70°C. Se hibridó a 42°C durante 18-20 horas en cámara húmeda preservados de la luz.

Los lavados se realizaron de la misma manera que en los cortes de criostato. Se realizó una contratinción con DAPI y se montaron con Vectashield.

Las secciones de hígado embebidas en parafina e hibridadas con sondas fluorescentes se utilizaron para la colocalización de las células de origen donante con los marcadores específicos de tipo celular.

3. D.3 *Combinación de inmunohistoquímica e hibridación 'in situ' con sondas fluorescentes*

Para identificar a qué tipo celular pertenecían las células cromosoma Y-positivas se realizaron conjuntamente en cortes de parafina los marcajes inmunohistoquímicos y la hibridación *in situ* con sonda fluorescente, para localizar cromosoma Y murino del donante, indicados anteriormente.

En primer lugar se realizó el marcaje con anticuerpos, se fotografiaron diversos campos de la preparación e inmediatamente se desmontó y se realizó una hibridación *in situ* conforme al protocolo explicado anteriormente para cortes en parafina. Se localizaron los mismos campos, se fotografiaron y se fusionaron las imágenes.

3. E Citometría de flujo

3. E.1 *Detección de eritrocitos fluorescentes circulantes*

Para la cuantificación de fluorocitos, eritrocitos de sangre periférica con acumulación de porfirinas que pueden ser detectados por citometría de flujo debido a la fluorescencia que emiten, se diluyeron 2 μ l de sangre periférica en 1 ml de PBS, 0,1% BSA, 0,02% azida sódica. Se analizó en un citómetro de flujo EPICSXL (Coulter Electronics, Hialeah, FL, EEUU) discriminando los eritrocitos mediante la captación de la señal FSC log versus SSC log. Los datos resultantes se analizaron utilizando el software EXP032 ADC Analysis (Applied Cytometry Systems; Dinnington, Sheffield, Reino Unido).

ANÁLISIS DE DATOS 4

4. A Captura y tratamiento de imágenes

Las fotografías de las preparaciones histológicas hibridadas con sondas fluorescentes y de los marcajes inmunohistoquímicos se capturaron con una cámara RT Color, SPOT (Diagnostic Instruments, Inc.), acoplada al microscopio de fluorescencia.

El conteo de células, y la co-localización de los diferentes marcajes mediante la superposición de imágenes se realizaron con el programa informático Corel Photo-Paint 12 (Versión 12.0.0.458).

4. B Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa informático GraphPad Prism 4 para Windows (GraphPad Software, Inc.). Debido a que el número de individuos en cada grupo está comprendido entre 5 y 7 se realizaron pruebas no paramétricas. Estas pruebas estadísticas son más adecuadas cuando el número de individuos por grupo es reducido. Para la comparación de los grupos, dos a dos, se utilizó la prueba no paramétrica de Mann Whitney.

Para estudiar si existía correlación entre dos variables estudiadas se usó el coeficiente de correlación de Spearman.

La hipótesis nula se rechazó cuando la "p" era menor que 0.05.

4. C Criterio de comparación entre grupos

Como se explicó al inicio de "Materiales y Métodos" (esquema de la página 46), se han establecido diversos grupos de animales con el fin de estudiar los objetivos que nos proponíamos. A continuación, se indican los factores que podrían influir en las diferencias que se observan en los resultados.

Primeramente, se realizaron comparaciones entre los grupos control de animales sanos y de animales con PPE para conocer los valores de referencia de los parámetros estudiados posteriormente en los grupos terapéuticos. De la misma manera, se evaluó el efecto de la edad comparando grupos de animales con 4 meses y grupos de animales con 11 meses, en aquellos parámetros que se consideraron susceptibles de ser modificados por la edad y/o evolución de la propia PPE.

Para comprobar que el procedimiento al que fueron sometidos los animales no alteraba las variables estudiadas se realizaron comparaciones entre el grupo de animales sanos control y el grupo 1 de terapia celular (animales sanos irradiados e injertados con médula ósea sana).

Para conocer qué consecuencias tenía en los animales *fch/fch* receptores el hecho de recibir un trasplante de médula ósea tras ser irradiados, se compararon sistemáticamente todos los resultados obtenidos con sus correspondientes controles sanos y enfermos de la misma edad.

Por último, se analizó el efecto que tenía sobre los animales receptores el tratamiento para movilizar las células madre hematopoyéticas procedentes de la médula ósea mediante G-CSF comparando los grupos 2 y 3 de terapia celular, ambos sacrificados 3 meses después de recibir el trasplante, correspondiente a 5 meses de edad, sin y con tratamiento.

RESULTADOS

ALTERACIONES ERITROPOYÉTICAS 1

De las dos vertientes clínicas con que se manifiesta la protoporfiria eritropoyética la cutánea es la más característica en los pacientes, ya que es la sintomatología definitoria de la enfermedad. Esta manifestación cutánea de la PPE está causada por la acumulación de porfirinas fundamentalmente en plasma.

Para estudiar si el trasplante de médula ósea había sido efectivo para corregir la acumulación de porfirinas responsable de la fotosensibilidad en los animales receptores, se midió la concentración de porfirinas en plasma y de protoporfirina en glóbulos rojos.

1. A Porfirinas en plasma

Los animales *fch/fch* presentaron una concentración de porfirinas en plasma 70 veces mayor que los ratones sanos. En todos los grupos de animales *fch/fch* que recibieron un trasplante de médula ósea de animales sanos la concentración de porfirinas en plasma se redujo drásticamente, respecto a los controles *fch/fch*, tras 3 semanas de trasplante: alrededor de 5 veces en TC2 (*fch/fch* vs. TC2, $p=0,1905$) y TC3 (*fch/fch* vs. TC3, $p=0,2571$) y cerca de 6 veces en TC4 (*fch/fch* vs. TC4, $p=0,1143$) (Tabla 1). En el caso del grupo TC4 se alcanzaron valores prácticamente normales a las 18 semanas después del trasplante (Tabla 1).

La corrección en la concentración de porfirinas en plasma en el grupo TC4 se mantuvo hasta el momento del sacrificio (39 semanas post-trasplante), como puede verse en la figura 14.

				1018 ± 311,5	26,24 ± 10,47	
			3	p < 0,05 (TC2 vs. +/+)	p < 0,05 (TC2 vs. +/+)	
TC2	σ +/+ en ♀ <i>fch/fch</i> (5 meses)	5	3	ns (TC2 vs. <i>fch/fch</i>)	p < 0,05 (TC2 vs. <i>fch/fch</i>)	
				11	p < 0,05 (TC2 vs. +/+)	ns (TC2 vs. +/+)
			6	11	p < 0,05 (TC2 vs. <i>fch/fch</i>)	p < 0,05 (TC2 vs. <i>fch/fch</i>)
					179,4 ± 65,18	4,06 ± 0,64
TC3	σ +/+ en ♀ <i>fch/fch</i> G-CSF (5 meses)	6	3	p < 0,01 (TC3 vs. +/+)	p < 0,01 (TC3 vs. +/+)	
				11	ns (TC3 vs. <i>fch/fch</i>)	p < 0,01 (TC3 vs. <i>fch/fch</i>)
			6		11	p < 0,01 (TC3 vs. +/+)
				1006 ± 242		28,48 ± 8,269
TC4	σ +/+ en ♀ <i>fch/fch</i> (11 meses)	7	3	p < 0,01 (TC4 vs. +/+)	p < 0,01 (TC4 vs. +/+)	
				11	ns (TC4 vs. <i>fch/fch</i>)	p < 0,05 (TC4 vs. <i>fch/fch</i>)
			7		11	p < 0,01 (TC4 vs. +/+)
				807,6 ± 269,6		18,64 ± 9,5
+/+	(4 meses)	6	11	p < 0,01 (TC4 vs. <i>fch/fch</i>)	ns (TC4 vs. <i>fch/fch</i>)	
				18	p < 0,01 (TC4 vs. +/+)	p < 0,01 (TC4 vs. +/+)
			6		18	p < 0,05 (TC4 vs. +/+)
				147 ± 31,2		5,6 ± 2,04
fch/fch	(4 meses)	6	6	116 ± 20,9	3,72 ± 1,18	
				70,03 ± 10,88	4,99 ± 0,90	
				4822 ± 3783	94,33 ± 30,52	
				p < 0,05 (+/+ vs. <i>fch/fch</i>)	p < 0,05 (+/+ vs. <i>fch/fch</i>)	

Tabla 1. Concentración de porfirinas en plasma expresada en nmoles de porfirinas por litro de plasma y de protoporfirina en glóbulos rojos expresada en nmoles de protoporfirina por gramo de hemoglobina. Edad trasplante: 8 semanas.

1. B Porphirinas en eritrocitos

Los animales *fch/fch* presentaron una concentración de protoporfirina en glóbulos rojos 20 veces mayor que los ratones sanos. En todos los grupos de animales *fch/fch* que recibieron un trasplante de médula ósea de animales sanos la concentración de protoporfirina en glóbulos rojos, referida a los gramos de hemoglobina, se redujo entre 3 y 5 veces (*fch/fch* vs. TC2, $p= 0,0159$; *fch/fch* vs. TC3, $p= 0,0095$; *fch/fch* vs. TC4, $p= 0,0286$) tras 3 semanas de trasplante y se normalizó a las 11 semanas post-trasplante (+/+ vs. TC2, TC3 y TC4, ns) (Tabla 1). En el caso del grupo TC4 los valores normales se mantuvieron hasta el momento del sacrificio (Figura 14.b).

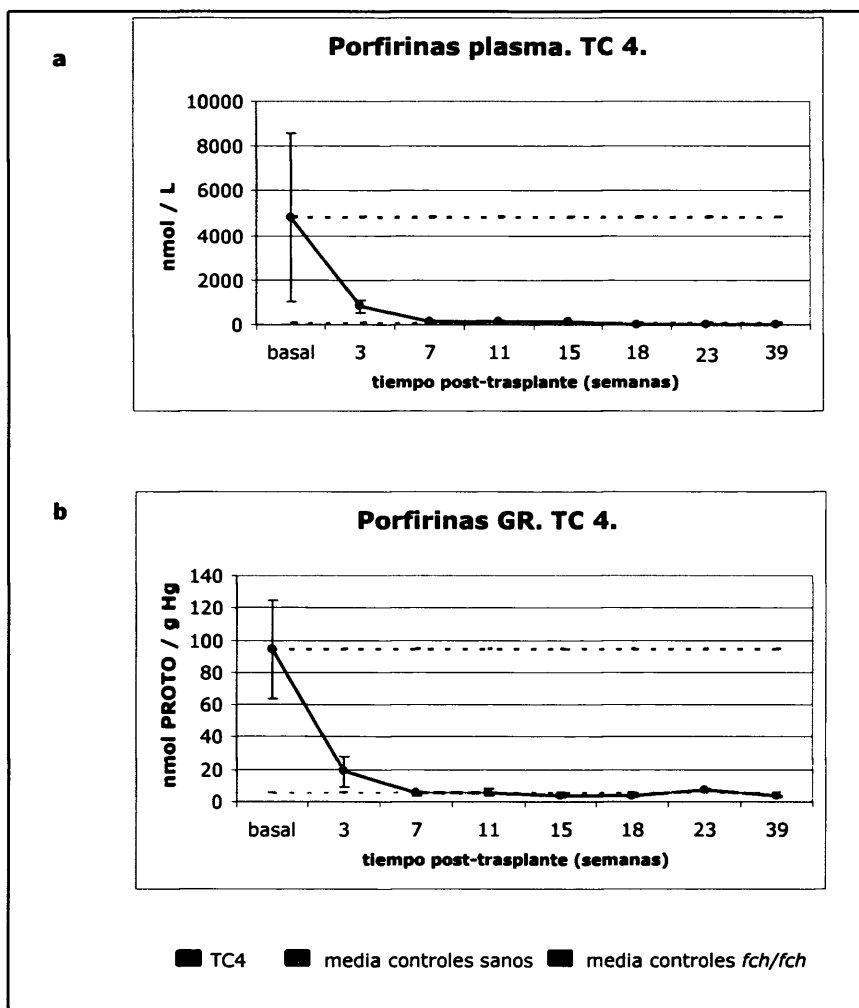


Figura 14. Concentración de porfirinas en plasma y glóbulos rojos de los ratones del grupo TC4. Evolución desde el momento del trasplante de médula ósea hasta el momento del sacrificio. Edad trasplante: 8 semanas.

1. C Parámetros hematológicos

Algunos pacientes con PPE desarrollan una anemia leve con hipocromía y microcitosis; en el modelo murino de protoporfiria eritropoyética se ha descrito anemia microcítica leve a partir de un mes de edad (Tutois y cols., 1991).

Los ratones con protoporfiria eritropoyética presentaron un recuento de eritrocitos normal, y unos valores de hemoglobina, hematocrito y volumen corpuscular medio disminuidos respecto a los animales control (Tabla 2).

			7,02 ± 2,81	9,04 ± 3,82	37,8 ± 3,21	42,04 ± 5,78
TC2	σ +/+ en ♀ <i>fch/fch</i> (5 meses)	5	ns	p < 0,01	ns	ns
			TC2 vs. +/+	TC2 vs. +/+	TC2 vs. +/+	TC2 vs. +/+
			ns	ns	ns	Ns
			TC2 vs. <i>fch/fch</i>	TC2 vs. <i>fch/fch</i>	TC2 vs. <i>fch/fch</i>	TC2 vs. <i>fch/fch</i>
			7,19 ± 8,1	8,1 ± 3,1	37,35 ± 5,15	40,43 ± 3,21
TC3	σ +/+ en ♀ <i>fch/fch</i> G-CSF (5 meses)	6	ns	p < 0,01	ns	p < 0,05
			TC3 vs. +/+	TC3 vs. +/+	TC3 vs. +/+	TC3 vs. +/+
			ns	ns	ns	ns
			TC3 vs. <i>fch/fch</i>	TC3 vs. <i>fch/fch</i>	TC3 vs. <i>fch/fch</i>	TC3 vs. <i>fch/fch</i>
			ns	ns	ns	ns
			TC3 vs. TC2	TC3 vs. TC2	TC3 vs. TC2	TC3 vs. TC2
+/+	(4 meses)	6	9,11 ± 1,39	14,45 ± 0,94	38,23 ± 1,46	43,96 ± 1,911
			7,77 ± 0,91	9,67 ± 1,34	31,1 ± 5,08	39,9 ± 2,16
<i>fch/fch</i>	(4 meses)	6	ns	p < 0,005	p < 0,05	p < 0,05
			<i>fch/fch</i> vs. +/+	<i>fch/fch</i> vs. +/+	<i>fch/fch</i> vs. +/+	<i>fch/fch</i> vs. +/+

Tabla 2. Parámetros hematológicos estudiados en controles sanos y enfermos y en los grupos 2 y 3 de terapia celular. RBC: recuento de glóbulos rojos, expresado en millón de células por microlitro; Hb.: hemoglobina, expresada en gramos por decilitro; Hto.: hematocrito, expresado en porcentaje; VCM: volumen corpuscular medio, expresado en femptolitros. Edad trasplante: 8 semanas.

Sin embargo, tras realizar el trasplante con médula ósea sana y disminuir significativamente la concentración de porfirinas en plasma y de protoporfirina en glóbulos rojos, la concentración de hemoglobina no se normalizó en ninguno de los grupos de terapia celular (TC2, TC3 y TC4), a pesar de que el recuento de eritrocitos fue similar al del grupo control sano.

También se caracterizaron otros parámetros hematológicos en los grupos TC2 y TC3 para comprobar si el tratamiento con el agente movilizador de células de médula ósea, G-CSF, los modificaba y contribuía a una mejor recuperación hematológica. La concentración de hemoglobina permaneció similar a la de los controles *fch/fch*, pero el hematocrito y el volumen corpuscular medio en los grupos TC2 y TC3 presentaron valores próximos a los que observamos en ratones controles sanos (Tabla 2).

Como hemos indicado, tampoco se observaron diferencias en la concentración de hemoglobina del grupo TC4 (sacrificados 9 meses después del trasplante; 8,943 g/dl \pm 0,808 g/dl) con los valores de los animales control enfermos ($p=0,3660$) ni con el grupo de terapia celular 2 ($p=0,2677$), aunque sí con la concentración de hemoglobina de los ratones control sanos ($p < 0.01$).

1. D Porcentaje de células donantes en la médula ósea de los animales receptores

Para comprobar que el procedimiento de radiación y posterior trasplante de médula ósea sana en los animales enfermos tuvo como consecuencia un injerto adecuado en los animales receptores, se cuantificó qué porcentaje de médula ósea era de origen donante.

Puesto que los animales receptores *fch/fch* eran hembras y recibieron médula ósea de ratones donantes machos, era posible caracterizar el injerto de médula ósea mediante hibridación *in situ* con una sonda fluorescente para el cromosoma Y. Para evaluar la sensibilidad de la técnica y corregir posibles errores de subestimación, se analizó la médula ósea de controles macho y se obtuvo que, como media, sólo se detectaba señal para el cromosoma Y en el 69,74% de las células. Por lo tanto, se aplicó un factor de corrección ($\times 1,434$) en los porcentajes de cromosomas Y detectados en la médula ósea de los animales receptores.

El porcentaje de células de médula ósea donde se detectó el cromosoma Y para el grupo TC4 y después de aplicar el factor de corrección, estaba comprendido entre 71,7% y 107% (91,4% \pm 12,4%).

1. E Porcentaje de fluerocites en sangre periférica de los animales receptores

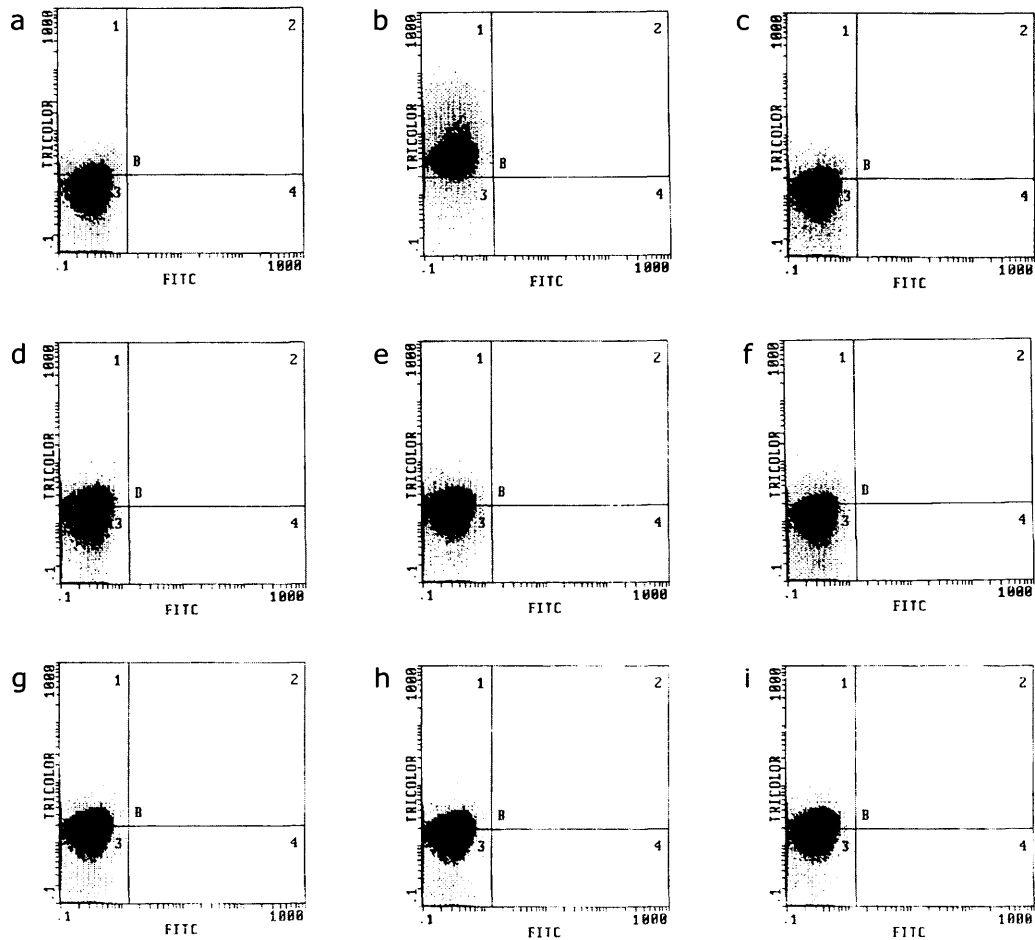


Figura 15. Células de sangre periférica analizadas para detectar fluorescencia roja característica de las porfirinas. Longitud de onda de excitación: 488 nm; longitud de onda de emisión: 675 nm \pm 10 nm. (a) sangre periférica de ratón control sano. (b) sangre periférica de ratón control *fch/fch*. (c-i) sangre periférica de ratones *fch/fch* trasplantados con médula ósea de ratones sanos (Grupo TC4).

En trabajos anteriores se describió que los eritrocitos de sangre periférica de los ratones con PPE presentaban una fluorescencia roja característica cuando eran analizados por citometría de flujo debido a la excesiva acumulación de porfirinas en dichas células (Fontanellas y cols., 2001; Richard y cols., 2001). En estos trabajos se comprobó que esta fluorescencia característica de los eritrocitos circulantes se perdía en la medida que la acumulación excesiva de porfirinas era corregida.

Para evaluar la eficiencia terapéutica del trasplante de médula ósea se calculó, mediante citometría de flujo, la proporción de células de sangre periférica que presentaban fluorescencia roja.

Se ajustaron los parámetros de manera que en un ratón sano se detectaba el 15% de las células analizadas como fluorocitos (Figura 15.a) y en un ratón con PPE se detectaba el 93% de fluorocitos en sangre periférica (Figura 15.b). Con estos ajustes se obtuvieron, para los animales del grupo TC4, valores que oscilaron entre 15,6% y 39% de fluorocitos (Figura 15.c-i), lo que correspondía a un injerto de entre 75,5% y 98,9%.

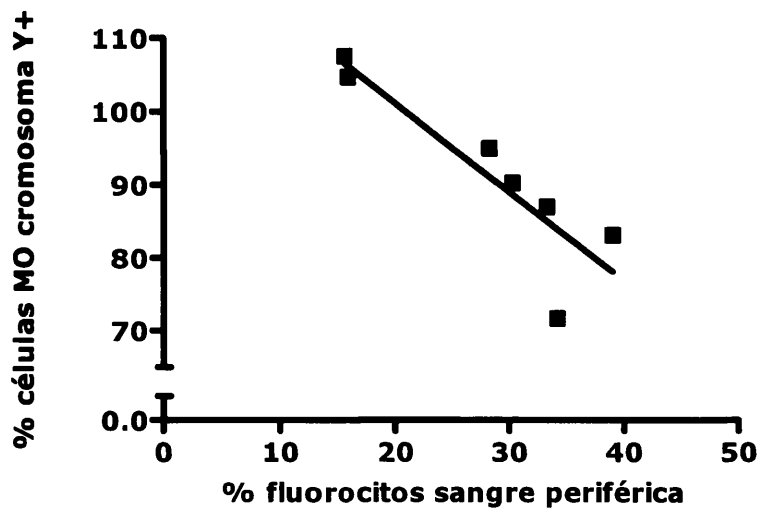


Figura 16. Correlación entre el porcentaje de células de sangre periférica en el que se detectó fluorescencia a 675 nm y el porcentaje en el que se detectó cromosoma Y.

El coeficiente de correlación de Spearman, r , entre el porcentaje de fluorocitos en sangre periférica y el porcentaje de células de médula ósea positivas para el cromosoma Y fue de $-0,9643$ (Figura 16).

MANIFESTACIÓN HEPÁTICA 2

La sintomatología hepática, si bien sólo aparece en un 5-10% de los pacientes con protoporfiria eritropoyética, es la responsable de los casos más graves descritos y en la mayoría de los pacientes se resuelve con trasplante hepático.

En este trabajo hemos querido estudiar el efecto que tiene sobre la función hepática de animales *fch/fch* el trasplante de médula ósea de animales sanos.

2. A Porfirinas en hígado

La acumulación excesiva de protoporfirina en el hígado de los ratones *fch/fch* está estrechamente relacionada con el daño hepatocelular, por lo que hemos estudiado la concentración de porfirinas en el hígado de los ratones receptores para comprobar si el trasplante de médula ósea contribuía a una disminución en dicha concentración.

Cuantificamos las porfirinas en el hígado de los ratones *fch/fch* y observamos que tenían una concentración de porfirinas en hígado 123 veces mayor que los ratones control sanos (Tabla 3).

Tres meses después del trasplante de médula ósea la concentración de porfirinas en hígado disminuyó un 50% y un 20% en los grupos de TC2 y TC3, respectivamente, respecto a la concentración de los animales control PPE. Y tras nueve meses de trasplante la concentración de porfirinas en hígado en el grupo TC4 disminuyó un 90% respecto a los controles *fch/fch* de la misma edad (Tabla 3).

TC1	♂ +/+ en ♀ +/+ (5 meses)	7	57 ± 42	ns (TC1 vs. +/+)
TC2	♂ +/+ en ♀ <i>fch/fch</i> (5 meses)	5	5764 ± 4817	p < 0,05 (TC2 vs. +/+) ns (TC2 vs. <i>fch/fch</i>)
TC3	♂ +/+ en ♀ <i>fch/fch</i> G-CSF (5 meses)	6	8588 ± 3318	p < 0,01 (TC3 vs. +/+) ns (TC3 vs. <i>fch/fch</i>) ns (TC3 vs. TC2)
TC4	♂ +/+ en ♀ <i>fch/fch</i> (11 meses)	7	989 ± 801	p < 0,01 (TC4 vs. +/+) p < 0,01 (TC4 vs. <i>fch/fch</i>) p < 0,05 (TC4 vs. TC2)
+/+	(4 meses)	10	89 ± 24	
<i>fch/fch</i>	(4 meses)	10	10985 ± 3758	p < 0,01 (<i>fch/fch</i> vs. +/+)

Tabla 3. Concentración de protoporfirina en hígado, expresada en nanomoles de protoporfirina por gramo de proteína. Edad trasplante: 8 semanas.

2. B Actividad de la ferroquelatasa en hígado

De acuerdo con lo publicado en este modelo animal (Tutois y cols., 1991), los ratones *fch/fch* presentaron una actividad de la ferroquelatasa en hígado disminuida respecto a la de ratones sanos control, siendo tan sólo el 9,7% de la actividad normal (Tabla 4).

Comprobamos que el procedimiento de radiación de los animales y posterior trasplante de médula ósea no afectaba a la actividad hepática de la ferroquelatasa, siendo incluso mayor en el hígado de los ratones del grupo TC1 que en los controles sanos (Tabla 4).

Tras 3 meses de trasplante la actividad hepática de la ferroquelatasa no varió ($p=0,1255$, TC2 vs. *fch/fch*). Sí varió después de 9 meses de trasplante (TC4): se duplicó respecto a los ratones controles *fch/fch* ($p<0,005$) y a los ratones del grupo TC2; en este último caso las diferencias estaban cerca de la significación estadística ($p=0,0556$) (Tabla 4).

TC1	σ +/+ en ♀ +/+ (5 meses)	7	2,733 ± 0,260	< 0,005 (TC1 vs. +/+)
TC2	σ +/+ en ♀ <i>fch/fch</i> (5 meses)	5	0,205 ± 0,088	< 0,005 (TC2 vs. +/+) ns (TC2 vs. <i>fch/fch</i>)
TC3	σ +/+ en ♀ <i>fch/fch</i> G-CSF (5 meses)	6	0,212 ± 0,053	< 0,005 (TC3 vs. +/+) ns (TC3 vs. <i>fch/fch</i>) ns (TC3 vs. TC2)
TC4	σ +/+ en ♀ <i>fch/fch</i> (11 meses)	7	0,345 ± 0,102	< 0,005 (TC4 vs. +/+) < 0,005 (TC4 vs. <i>fch/fch</i>) ns (TC4 vs. TC2)
+/+	(4 meses)	6	1,781 ± 0,169	
<i>fch/fch</i>	(4 meses)	6	0,173 ± 0,021	< 0,005 (<i>fch/fch</i> vs. +/+)

Tabla 4. Actividad de la ferroquelatasa en hígado expresada en nanomoles de protoporfirina-Zn formada por gramo de proteína y hora a 37°C. Edad trasplante: 8 semanas.

2. C Parámetros de función hepática

Para evaluar el daño hepático de los ratones antes de recibir el trasplante de médula ósea y realizar un seguimiento tras el proceso terapéutico, se midieron algunos parámetros séricos de función hepática.

La concentración de aspartato aminotransferasa (AST) y más concretamente la de alanina aminotransferasa (ALT) son indicadores de citolisis hepática. En plasma de los ratones controles *fch/fch* la concentración de estas transaminasas fue

8,4 y 7,6 veces mayor, respectivamente, que en el plasma de ratones controles sanos (Tabla 5).

En los ratones que recibieron un trasplante de médula ósea y fueron sacrificados 3 meses después de este trasplante (TC2) se observó una disminución en la concentración de ambas transaminasas, reduciéndose en un 40% y un 35% respectivamente tras 11 semanas de trasplante, aunque no se alcanzaron diferencias significativas con el grupo de ratones control *fch/fch* (Tabla 5).

En el grupo TC3, que recibió 3 dosis de G-CSF, se observó una disminución del 20% en la concentración de ALT, la transaminasa específica de hígado, mientras que en el caso de la AST no se observó mejoría, a las 11 semanas después del trasplante (Tabla 5).

Se realizó un seguimiento de estos parámetros a largo plazo en el grupo TC4, donde observamos disminución de las concentraciones de ambas transaminasas en plasma de un 70% (TC4 vs. +/+, $p < 0,01$; TC4 vs. *fch/fch*, $p < 0,01$) y un 60% (TC4 vs. +/+, $p < 0,01$; TC4 vs. *fch/fch*, $p < 0,05$), respectivamente para AST y ALT, a las 23 semanas después del trasplante (Figura 17.a y 17.b).

Otros parámetros séricos de función hepática estudiados fueron la fosfatasa alcalina, parámetro altamente sensible a la colestasis biliar y la bilirrubina total, indicadora de disfunción hepática.

En el grupo TC2 la concentración de fosfatasa alcalina disminuyó un 35% a las 11 semanas después del trasplante respecto a los controles *fch/fch* y la concentración de bilirrubina total en el mismo tiempo se redujo hasta alcanzar valores normales (Tabla 6).

En el grupo TC3 la concentración de bilirrubina total siguió la misma evolución que en el grupo TC2; la concentración de fosfatasa alcalina también se redujo, aunque sólo un 17% (Tabla 6).



				625 ± 162	474 ± 157
			7	p < 0,01 (TC2 vs. +/+)	p < 0,01 (TC2 vs. +/+)
TC2	♂ +/+ en ♀ <i>fch/fch</i> (5 meses)	5		ns (TC2 vs. <i>fch/fch</i>)	ns (TC2 vs. <i>fch/fch</i>)
				415 ± 109	314 ± 126
		11		p < 0,01 (TC2 vs. +/+)	p < 0,01 (TC2 vs. +/+)
				ns (TC2 vs. <i>fch/fch</i>)	ns (TC2 vs. <i>fch/fch</i>)
TC3	♂ +/+ en ♀ <i>fch/fch</i> G-CSF (5 meses)	6	7	651 ± 423	512 ± 273
				p < 0,01 (TC3 vs. +/+)	p < 0,01 (TC3 vs. +/+)
			ns (TC3 vs. <i>fch/fch</i>)	ns (TC3 vs. <i>fch/fch</i>)	
			ns (TC3 vs. TC2)	ns (TC3 vs. TC2)	
		11		740 ± 695	400 ± 125
				p < 0,01 (TC3 vs. +/+)	p < 0,01 (TC3 vs. +/+)
	ns (TC3 vs. <i>fch/fch</i>)	ns (TC3 vs. <i>fch/fch</i>)			
	ns (TC3 vs. TC2)	ns (TC3 vs. TC2)			
+/+	(4 meses)	5		79 ± 16	63 ± 15
<i>fch/fch</i>	(4 meses)	5		665 ± 213	483 ± 162
				p < 0,01 (<i>fch/fch</i> vs. +/+)	p < 0,01 (<i>fch/fch</i> vs. +/+)

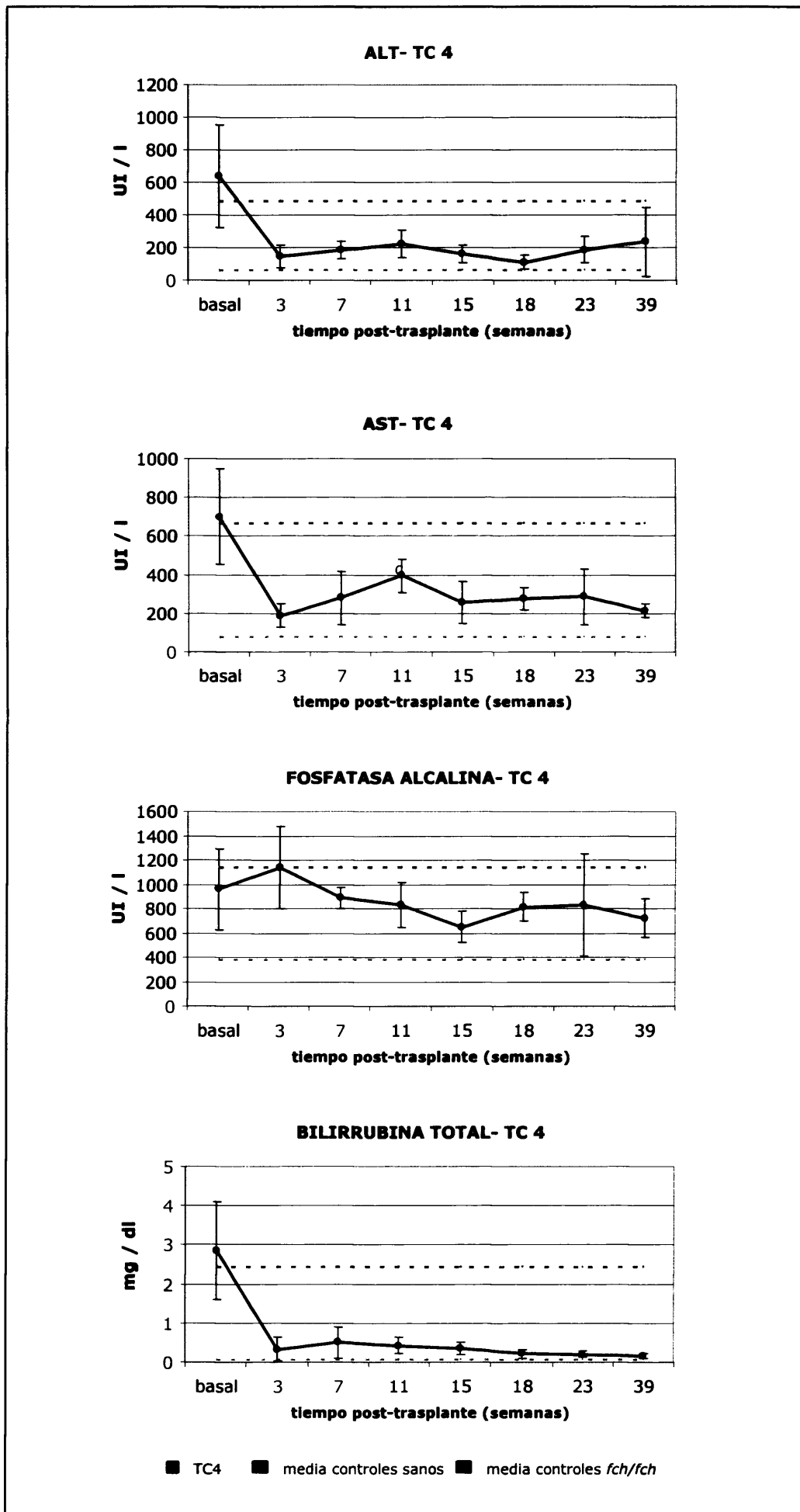
Tabla 5. Concentraciones plasmáticas de aspartato aminotransferasa (AST) y de alanino aminotransferasa (ALT) en grupos control y en los grupos TC2 y TC3, 7 y 11 semanas después de recibir el trasplante de médula ósea sana. Edad trasplante: 8 semanas.

A partir de la semana 15 post-trasplante en el grupo TC4 la concentración plasmática de fosfatasa alcalina disminuyó hasta situarse en valores intermedios entre los presentados por los controles +/+ (TC4 vs. +/+, $p < 0,01$) y los controles *fch/fch* (TC4 vs. *fch/fch*, $p < 0,05$). Estos valores intermedios se mantuvieron hasta el momento del sacrificio (Figura 17.c). En el caso de la bilirrubina total, de la misma manera que ocurría en los grupos TC2 y TC3, a las 7 semanas después del trasplante su concentración plasmática se había reducido un 80% respecto a la de los controles enfermos (TC4 vs. *fch/fch*, $p < 0,05$) (Figura 17.d).

				1044 ± 288	0,43 ± 0,44
			7	p < 0,01 (TC2 vs. +/+)	ns (TC2 vs. +/+)
TC2	♂ +/+ en ♀ <i>fch/fch</i> (5 meses)	5	7	ns (TC2 vs. <i>fch/fch</i>)	p < 0,01 (TC2 vs. <i>fch/fch</i>)
				725 ± 154	0,054 ± 0,011
			11	p < 0,01 (TC2 vs. +/+)	ns (TC2 vs. +/+)
			11	p < 0,05 (TC2 vs. <i>fch/fch</i>)	p < 0,01 (TC2 vs. <i>fch/fch</i>)
				1057 ± 235	0,48 ± 0,46
			7	p < 0,01 (TC3 vs. +/+)	ns (TC3 vs. +/+)
TC3	♂ +/+ en ♀ <i>fch/fch</i> G-CSF (5 meses)	6	7	ns (TC3 vs. <i>fch/fch</i>)	p < 0,01 (TC3 vs. <i>fch/fch</i>)
				ns (TC3 vs. TC2)	ns (TC3 vs. TC2)
			11	p < 0,01 (TC3 vs. +/+)	ns (TC3 vs. +/+)
			11	ns (TC3 vs. <i>fch/fch</i>)	p < 0,01 (TC3 vs. <i>fch/fch</i>)
				ns (TC3 vs. TC2)	ns (TC3 vs. TC2)
+/+	(4 meses)	5		378 ± 92	0,059 ± 0,021
<i>fch/fch</i>	(4 meses)	5		1141 ± 259	2,424 ± 0,499
				p < 0,01 (<i>fch/fch</i> vs. +/+)	p < 0,01 (<i>fch/fch</i> vs. +/+)

Tabla 6. Concentraciones plasmáticas de fosfatasa alcalina y de bilirrubina total en grupos control y en los grupos TC2 y TC3, 7 y 11 semanas después de recibir el trasplante de médula ósea sana. Edad trasplante: 8 semanas.

En la página siguiente: Figura 17. Concentraciones plasmáticas de AST, ALT, fosfatasa alcalina y bilirrubina total en los ratones del grupo TC4. Evolución desde el momento del trasplante de médula ósea hasta el momento del sacrificio (semana 39 post-trasplante).



2. D Concentración de marcadores tumorales en homogenados de hígado

Se ha descrito la presencia de hepatocarcinoma en ratones *fch/fch* de más de 6 meses de edad (Libbretch y cols., 2003); por ello, quisimos valorar si existían modificaciones en las concentraciones de algunos marcadores empleados habitualmente en clínica para la detección de tumores en los ratones protoporfíricos.

En primer lugar se estudió si existían diferencias en las concentraciones de AFP, CA 19.9, HGF y TNF- α entre los ratones sanos y los ratones con protoporfiria eritropoyética. Observamos que a los cuatro meses de edad no existían diferencias en las concentraciones de los cuatro marcadores tumorales estudiados entre ambos grupos (+/+ vs. *fch/fch*: AFP: $p=0,3939$; CA 19.9: $p=0,3295$ y TNF- α : $p=0,9307$).

Cuando estudiamos estos parámetros en los animales con 11 meses de edad nos encontramos que sí se observaban diferencias en las concentraciones de AFP, CA 19.9 y HGF entre los grupos control sanos y *fch/fch* siendo mayores las concentraciones de AFP (2,4 veces mayor) y CA 19.9 en los ratones con PPE ($p<0,005$ y $p<0,05$, respectivamente) y menor la concentración de HGF (3 veces menor) en dichos ratones ($p<0,05$). La concentración de TNF- α no estaba modificada en los ratones con PPE a los 11 meses de edad ($p=0,4286$).

Posteriormente se evaluó la posible modificación en las concentraciones de estos marcadores tumorales tras la terapia celular. Para ello se estudió en primer lugar si el procedimiento de radiación y ulterior trasplante al que son sometidos los animales podría alterar las concentraciones de los marcadores tumorales medidos en homogenados de hígado. Al comparar dichas concentraciones entre el grupo TC1 (hembras sanas que recibieron trasplante de médula ósea de machos sanos) y su correspondiente grupo control sano (4 meses) se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 7).

También caracterizamos las concentraciones de los marcadores tumorales en los animales que recibieron el trasplante terapéutico. No se observaron diferencias en las concentraciones de AFP, CA19.9 y HGF en los ratones que fueron sacrificados 3 meses después de recibir el trasplante de médula ósea respecto a sus controles.

Sí se apreciaron diferencias en la concentración de TNF- α , aunque no tenían significación estadística y podrían deberse al efecto del trasplante.

TC1	σ +/+ en \varnothing +/+ (5 meses)	7	0,88 \pm 0,62	2,00 \pm 0,19	34,8 \pm 2,1	
	+/+	(4 meses)	6	1,57 \pm 0,72	3,23 \pm 0,71	51,6 \pm 12,7
	p			< 0,05	< 0,05	< 0,01

Tabla 7. Concentraciones de AFP, CA 19.9 y TNF- α en ratones control +/+ y ratones del grupo TC1.

Tampoco variaron las concentraciones en hígado de marcadores tumorales por recibir un tratamiento con el agente movilizador de progenitores hematopoyéticos de médula ósea, G-CSF, como se puso de manifiesto al comparar los grupos TC2 y TC3, ambos sacrificados 3 meses después de recibir el trasplante, sin y con movilizador respectivamente (AFP: $p=0,7922$; CA 19.9: $p=0,1797$; HGF: $p=0,1111$ y TNF- α : $p=0,4286$).

Tras recibir el trasplante de médula ósea no se observaron diferencias significativas entre la concentración de marcadores tumorales en hígado de los ratones de TC4 (sacrificados 9 meses después del trasplante) y sus correspondientes controles enfermos, a excepción de lo que ocurre en CA 19.9 en el que aumentan aún más que en dichos controles ($p<0,005$). La concentración de AFP disminuyó un 40% en los ratones del grupo TC4 respecto a los ratones *fch/fch* de 11 meses; sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p=0,0732$). En el caso de HGF y TNF- α las concentraciones son muy similares a las de sus correspondientes controles enfermos (Figura 18).

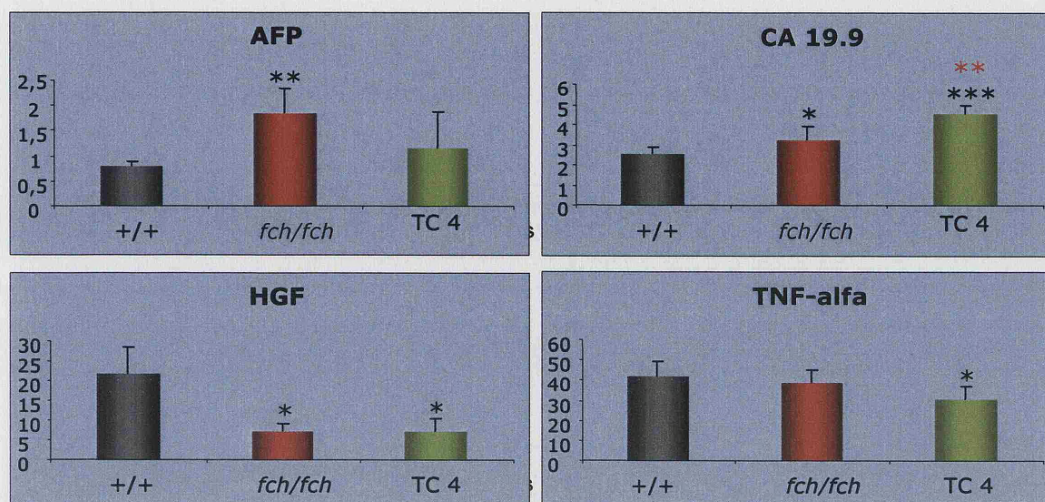


Figura 18. Concentraciones de AFP, CA 19.9 y TNF- α en ratones control +/+, *fch/fch* y grupo TC4. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$. En negro, comparación con controles +/+; en rojo, comparación con controles *fch/fch*.

2. E Actividad del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial en homogenados de hígado

Trabajos previos han descrito una asociación entre la acumulación de protoporfirina y los requerimientos intracelulares de ATP y las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria mitocondrial en el hígado, especialmente del complejo IV. Esto implicaría que un incremento en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial podría dar cierto grado de protección contra el daño hepático en ratones con PPE ocasionado por la acumulación excesiva de protoporfirina (Navarro y cols., 2005).

En este trabajo hemos estudiado si el trasplante de médula ósea modifica la actividad del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial.

Como en estudios anteriores, observamos una actividad aumentada del complejo IV en ratones con protoporfirina eritropoyética a los 4 meses de edad respecto a controles sanos (Tabla 8); sin embargo, las diferencias entre los grupos control +/+ y *fch/fch* a los 11 meses de edad no se mantuvieron, aumentando dicha actividad en ambos grupos.

En los grupos de animales *fch/fch* que recibieron un trasplante de médula ósea y fueron sacrificados 3 meses después (TC2 y TC3), la actividad del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial fue mayor que la del grupo control *fch/fch*, presentando diferencias estadísticamente significativas (TC2 vs. *fch/fch*, $p < 0,005$) (Tabla 8).

En el caso del grupo TC4, sacrificado 9 meses después de recibir el trasplante de médula ósea, no se encontraron diferencias en la actividad del complejo IV al compararlo con los grupos control de su misma edad (TC4 vs. +/+, $p = ns$; TC4 vs. *fch/fch*, $p = ns$) (Tabla 8).

TC1	♂ +/+ en ♀ +/+ (5 meses)	7	45,69 ± 12,35	< 0,01 (TC1 vs. +/+)
TC2	♂ +/+ en ♀ <i>fch/fch</i> (5 meses)	5	87,33 ± 17,08	< 0,01 (TC2 vs. +/+) < 0,01 (TC2 vs. <i>fch/fch</i>)
TC3	♂ +/+ en ♀ <i>fch/fch</i> G-CSF (5 meses)	6	68,83 ± 16,51	ns (TC3 vs. TC2)
+/+	(4 meses)	6	23,53 ± 10,23	
<i>fch/fch</i>	(4 meses)	6	38,26 ± 15,44	< 0,05 (<i>fch/fch</i> vs. +/+)
TC4	♂ +/+ en ♀ <i>fch/fch</i> (11 meses)	7	59,34 ± 18,598	ns (TC4 vs. +/+) ns (TC4 vs. <i>fch/fch</i>) < 0,05 (TC4 vs. TC2)
+/+	(11 meses)	6	54,58 ± 9,8	< 0,01 (+/+ 11m vs. +/+ 4m)
<i>fch/fch</i>	(11 meses)	6	63,08 ± 21,33	< 0,05 (<i>fch/fch</i> 11m vs. <i>fch/fch</i> 4m) ns (<i>fch/fch</i> vs. +/+)

Tabla 8. Actividad del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial referida a la actividad de la citrato sintasa.

2. F Estudio histológico del hígado

Se realizó un estudio histológico en cortes de hígado tanto de grupos control como de los grupos de terapia celular con el fin de evaluar a nivel histológico qué consecuencias podía tener el trasplante de médula ósea en el hígado.

2. F.1 ***Histología en cortes de hígado de ratones 'fch/fch'***

Primeramente se estudió el grupo control de ratones *fch/fch*. La tinción con hematoxilina-eosina nos mostró una arquitectura del hígado levemente alterada; observamos infiltrados inflamatorios de leves a moderados en los espacios porta (Figura 19.e), cuerpos de Councilman (Figura 19.e), signo de necrosis hepatocelular, y depósitos marrones en el interior de los canalículos biliares (Figura 19.f) y de las células de Kupffer (Figura 19.d), correspondiente a pigmento biliar rico en protoporfirina fagocitada.

Los conductos biliares estaban dilatados y presentaban pigmento biliar en la luz (Figura 19.f), con presencia de focos de reacción gigantomielocelular a cuerpo extraño, debido probablemente a que la distensión del conducto había terminado por romper el epitelio, liberando el contenido al medio, lo que favoreció la reacción a cuerpo extraño.

Los ratones protoporfíricos presentaban también fibrosis portal y periportal, sin cambios significativos en la morfológica del hepatocito. Se identificaron áreas concretas como nódulos regenerativos, si bien eran escasos en ratones de 4 meses.

En alguno de los controles *fch/fch* de 11 meses de edad se observaron lesiones nodulares macroscópicas de unos pocos milímetros de tamaño en la superficie hepática. No se observaron depósitos de hierro.

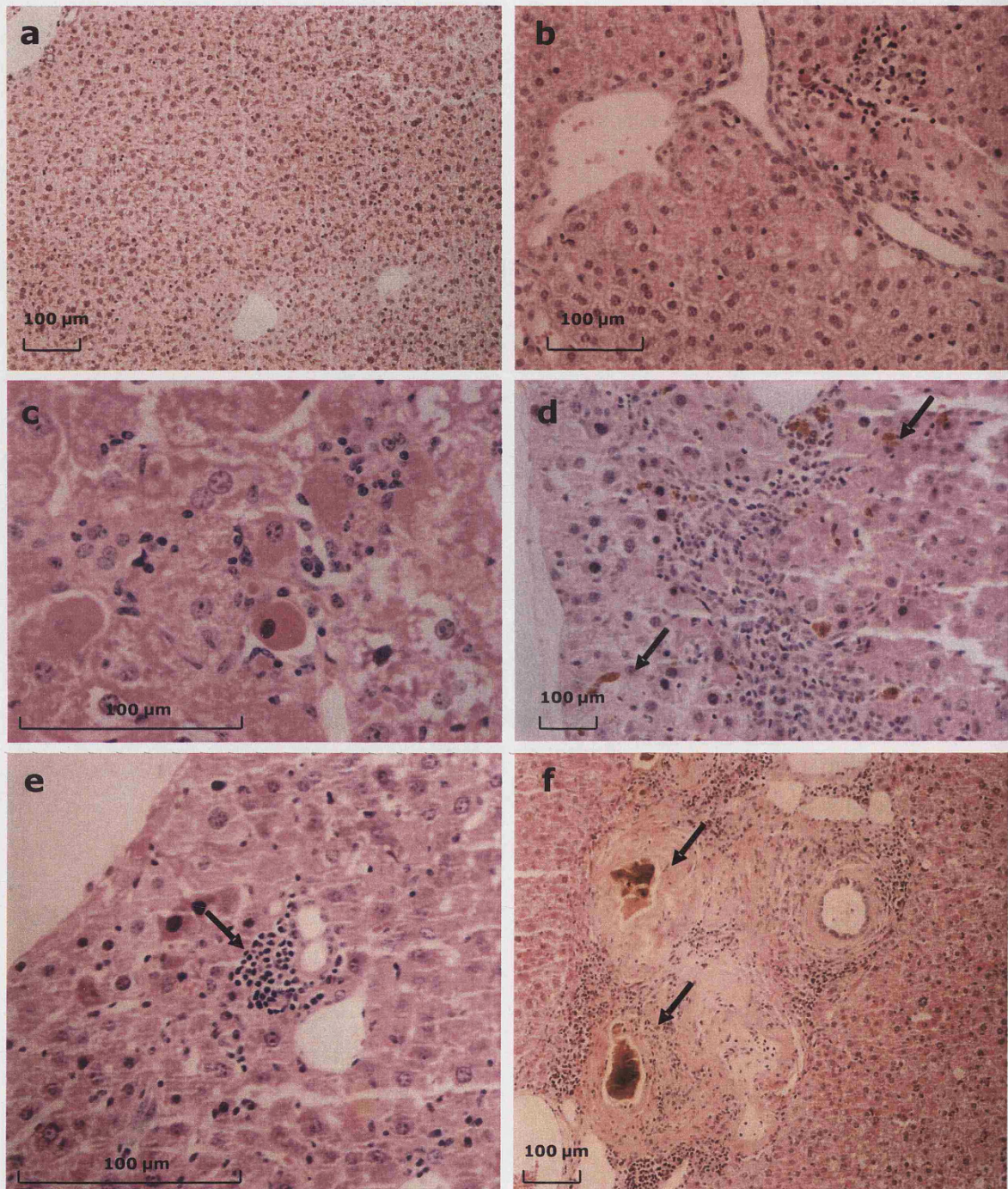


Figura 19. Tinción con hematoxilina-eosina en cortes de hígado de ratones control sanos (a-b) y *fch/fch* (c-f). (a,b) Arquitectura normal del tejido hepático, anatomía normal de los espacios porta. (d) Depósitos de protoporfirina en el parénquima hepático de ratones *fch/fch*. (e) Infiltrado inflamatorio en hígado *fch/fch*. (f) Depósitos de protoporfirina en la luz de conductos biliares dilatados. Daño en el epitelio biliar.

2. F.2 Histología en cortes de hígado de los grupos TC2 y TC3

La tinción con hematoxilina-eosina mostró una arquitectura del hígado similar a la descrita en los ratones *fch/fch* en los cortes histológicos de los grupos TC2 y TC3, sacrificados 3 meses después del trasplante, sin y con G-CSF respectivamente.

Aunque existía gran heterogeneidad intragrupo respecto a las características observadas en los ratones *fch/fch* control, sí podemos afirmar que, en términos generales, se observó en los ratones que recibieron 3 dosis del movilizador de células progenitoras hematopoyéticas (TC3) mayor número de infiltrados inflamatorios, mayor número de depósitos de protoporfirina en la zona periportal y en los canalículos biliares y mayor dilatación y proliferación de éstos. También fue más frecuente en el grupo TC3 la formación de puentes fibróticos que unían espacios porta.

En la tinción con hematoxilina-eosina se apreció en alguno de los animales la presencia de cuerpos de Councilman, cuerpos acidofílicos indicadores de necrosis hepatocelular aislada.

La presencia de infiltrados inflamatorios variaba considerablemente de unos animales a otros. Los infiltrados inflamatorios de tipo mixto observados en la mayoría de los animales del grupo TC3, ocasionaron distensión de la zona de interfase del espacio porta, con progresión de este infiltrado hacia el parénquima hepático (Figura 20.d). También existían focos inflamatorios adyacentes a las venas centrolobulillares. En el grupo TC2 el infiltrado inflamatorio estaba menos localizado, era más difuso, con extensión al parénquima hepático pero con menor intensidad.

En dos de los cinco ratones del grupo de TC2 no se detectaron lesiones en los conductos biliares y en otros dos ratones la presencia de pigmento biliar rico en protoporfirina era escasa. En el hígado de los ratones del grupo TC3 se observó pigmento biliar rico en protoporfirina en el interior de macrófagos de las áreas periportales y, ocasionalmente, de las áreas pericentrolobulillar e interhepatocitaria. También existía una marcada dilatación de los conductos biliares, cuya luz estaba ocupada prácticamente en su totalidad por protoporfirina (Figura 20.d). En cuatro de estos ratones y en un ratón del grupo TC2 se observó proliferación de pequeños

conductos biliares en las zonas adyacentes a aquéllas donde los conductos biliares estaban dilatados por la presencia de pigmento biliar en su luz.

Con la tinción tricrómica de Masson se caracterizó fibrosis de variada intensidad, desde fibrosis mínima e incluso dudosa, únicamente con cierta prominencia del tejido fibroso periportal hasta acusada formación de puentes fibrosos que unían los espacios porta (Figura 20.e). Esta fibrosis, como hemos indicado anteriormente, era más intensa en el grupo TC3. También se observó que la presencia de puentes fibrosos se correlacionaba con la presencia de lesiones nodulares visibles macroscópicamente y de color blanquecino en la superficie del hígado similares a las observadas en los controles *fch/fch* de mayor edad. Estas lesiones macroscópicas estaban presentes en el 30% y en el 40% de los ratones de los grupos de TC2 y TC3, respectivamente.

En algún animal aparecieron pequeños focos de esteatosis (Figura 20.a), constituidos por hepatocitos de citoplasma vacuolado de apariencia lipídica que formaban un agregado más o menos delimitado, dependiendo del ratón.

También se observaron en algún animal numerosas figuras mitóticas distribuidas por el lobulillo hepático (Figura 20.b).

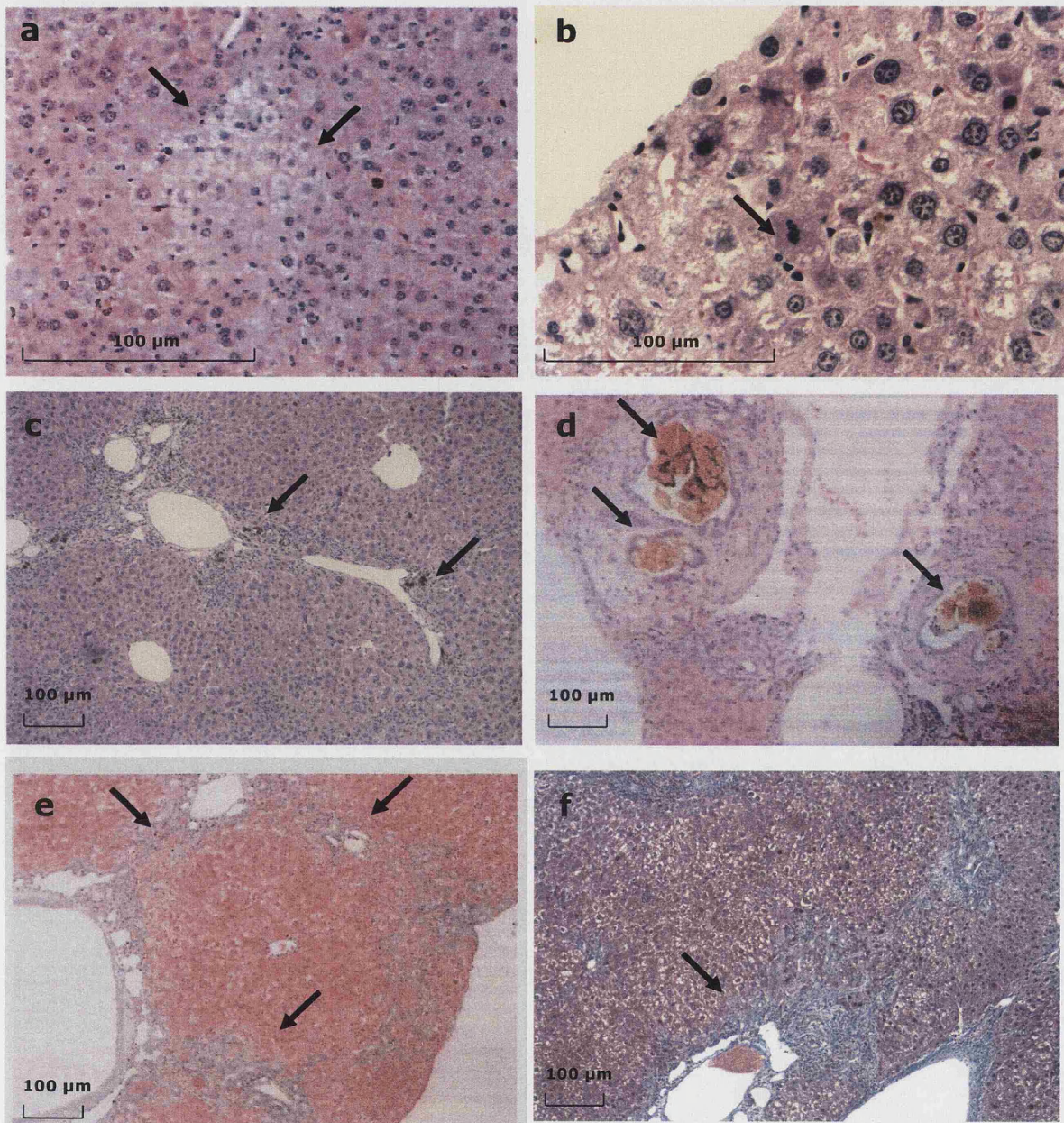


Figura 20. Tinción con hematoxilina-eosina (a-d) y tinción tricrómica de Masson (e-f) en cortes de hígado de ratones *fch/fch* trasplantados con médula ósea de ratones sanos y sacrificados 3 meses después del trasplante (TC2 y TC3). (a) Esteatosis. (b) Mitosis. Depósitos de protoporfirina en el parénquima hepático y región centrolobulillar (c) y espacios porta (d). (d) Distensión de los conductos biliares. (e) Fibrosis porto-portal con establecimiento de puentes. (f) Fibrosis periportal.

2. F.3 Histología en cortes de hígado del grupo TC4

La tinción con hematoxilina-eosina mostró una arquitectura del hígado prácticamente normal en los animales del grupo TC4 (Figura 21 a-b). En general, se observó una mejoría de este grupo respecto al grupo control *fch/fch* y los grupos TC2 y TC3.

Tras 9 meses de trasplante de médula ósea se redujeron los depósitos de protoporfirina. Estos depósitos se localizaron fundamentalmente en las zonas porta (Figura 21.b), aunque en menor cantidad que en otros grupos. No se encontró distensión ni proliferación de los conductos biliares. También se observaron infiltrados inflamatorios ocasionales alrededor de pigmento biliar (Figura 21.c).

En raros casos se detectó fibrosis, siendo ésta más difusa que en los grupos control *fch/fch* y en los grupos TC2 y TC3. De la misma manera que ocurría en los grupos TC2 y TC3 se observaron lesiones nodulares macroscópicas en la superficie hepática del 30% de los animales de este grupo. No se detectaron depósitos de hierro en ninguno de los grupos de terapia celular.

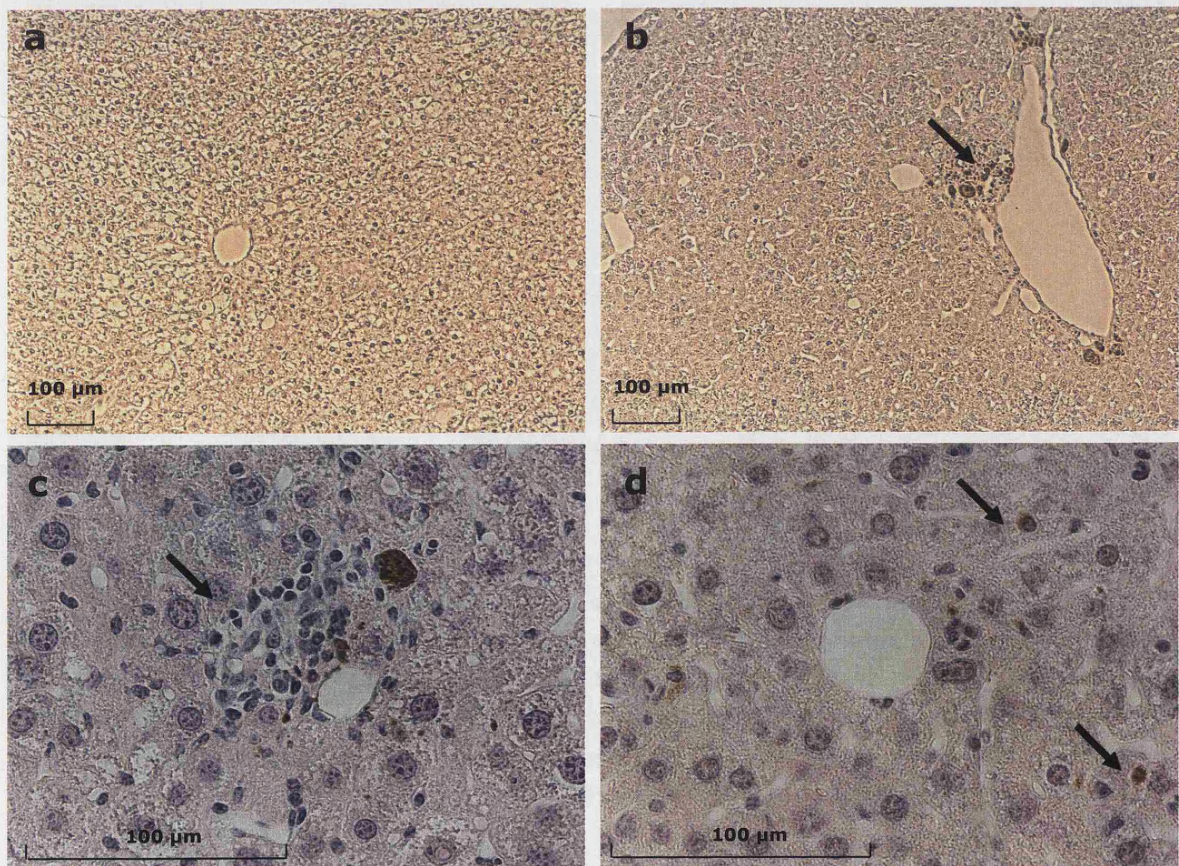


Figura 21. Tinción hematoxilina-eosina de cortes de hígado de ratones *fch/fch* trasplantados con médula ósea de ratones sanos y sacrificados 9 meses después del trasplante (TC4). (a) Arquitectura normal del tejido hepático. (b) Depósitos de protoporfirina periportales. (c) Ocasionales infiltrados inflamatorios. (d) Depósitos de protoporfirina en el parénquima hepático.

2. F.4 **Detección de células de origen donante en el hígado de los animales receptores**

Para la detección de las células donantes, procedentes de machos, en los hígados de los animales receptores hembras, se hibridaron secciones histológicas de hígado de 5 μm cortadas en criostato con una sonda específica para el cromosoma Y conjugada con FITC.

Se determinó la sensibilidad de la técnica de hibridación *in situ* con una sonda fluorescente (FISH) específica del cromosoma Y hibridando cortes de hígado de ratones macho (Figura 22). Se contabilizaron en el microscopio 7 campos con un aumento de 400x. De las 2500 células analizadas, 1928 fueron positivas; por lo tanto, detectamos el cromosoma Y en el 78% de las células y el factor de corrección resultante fue 1,37. Las señales observadas mediante la técnica de FISH aparecían en forma de manchas redondeadas o frecuentemente alargadas y localizadas mayoritariamente en la periferia del núcleo.

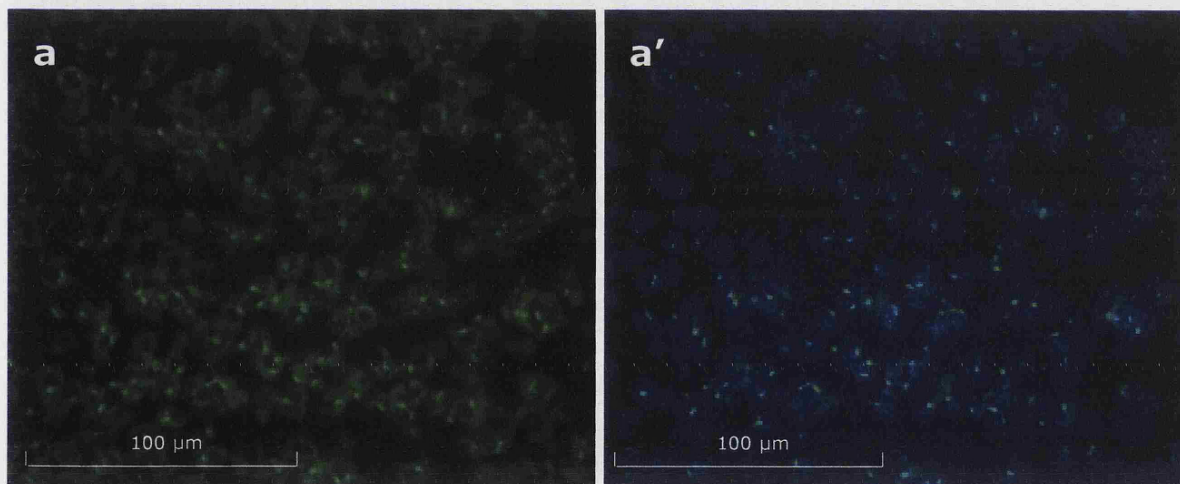


Figura 22. FISH para el cromosoma Y en hígado de ratón macho sano. (a) Cromosomas Y marcados con FITC (verde). (a') Superposición de núcleos (azul) y señales de los cromosomas Y.

A continuación, estudiamos el porcentaje de células donantes en el hígado de los ratones receptores del trasplante de médula ósea. Se analizaron entre 4 y 6 campos por cada ratón de los grupos TC2, TC3 y TC4, hasta un total de 23000 células, contando un mínimo de 500 células en cada animal.

Los resultados del recuento de células positivas para el cromosoma Y en los distintos grupos de terapia celular se presentan en la tabla 9.

TC2	♂ +/+ en ♀ <i>fch/fch</i> (5 meses)	5	26,3 ± 7,8	
TC3	♂ +/+ en ♀ <i>fch/fch</i> G-CSF (5 meses)	6	22,3 ± 7,0	ns TC3 VS. TC2
TC4	♂ +/+ en ♀ <i>fch/fch</i> (11 meses)	7	34,7 ± 15,5	ns TC4 VS. TC2

Tabla 9. Porcentajes de células positivas para el marcaje con sondas específicas de cromosoma Y referidas al número total de células contadas, después de aplicar el factor de corrección.

En todos los ratones la distribución de las células portadoras de cromosoma Y fue heterogénea, por lo que el porcentaje total de células positivas se calculó como la media de diversos campos, con mayor o menor presencia de señales.

En los grupos TC2 y TC3 la mayoría de las señales de cromosoma Y se encontraron en núcleos de tamaño pequeño, fundamentalmente en zonas periportales, aunque también aparecieron señales positivas en núcleos de distinto tamaño del parénquima hepático (Figura 23). No existen diferencias estadísticamente significativas en el número de células portadoras de cromosoma Y entre los dos grupos de ratones que fueron sacrificados 3 meses después del trasplante, con (TC3) y sin movilizador (TC2) de células madre hematopoyéticas, (Tabla 9).

En el grupo TC4, sacrificado 9 meses después del trasplante, se detectó un mayor número de señales positivas para el cromosoma Y, aunque esta diferencia no tiene significación estadística (Tabla 9). Las señales se localizaron también en gran medida en núcleos pequeños de las zonas periportales, pero en este caso se observó más presencia de señales en núcleos del parénquima hepático (Figura 23).

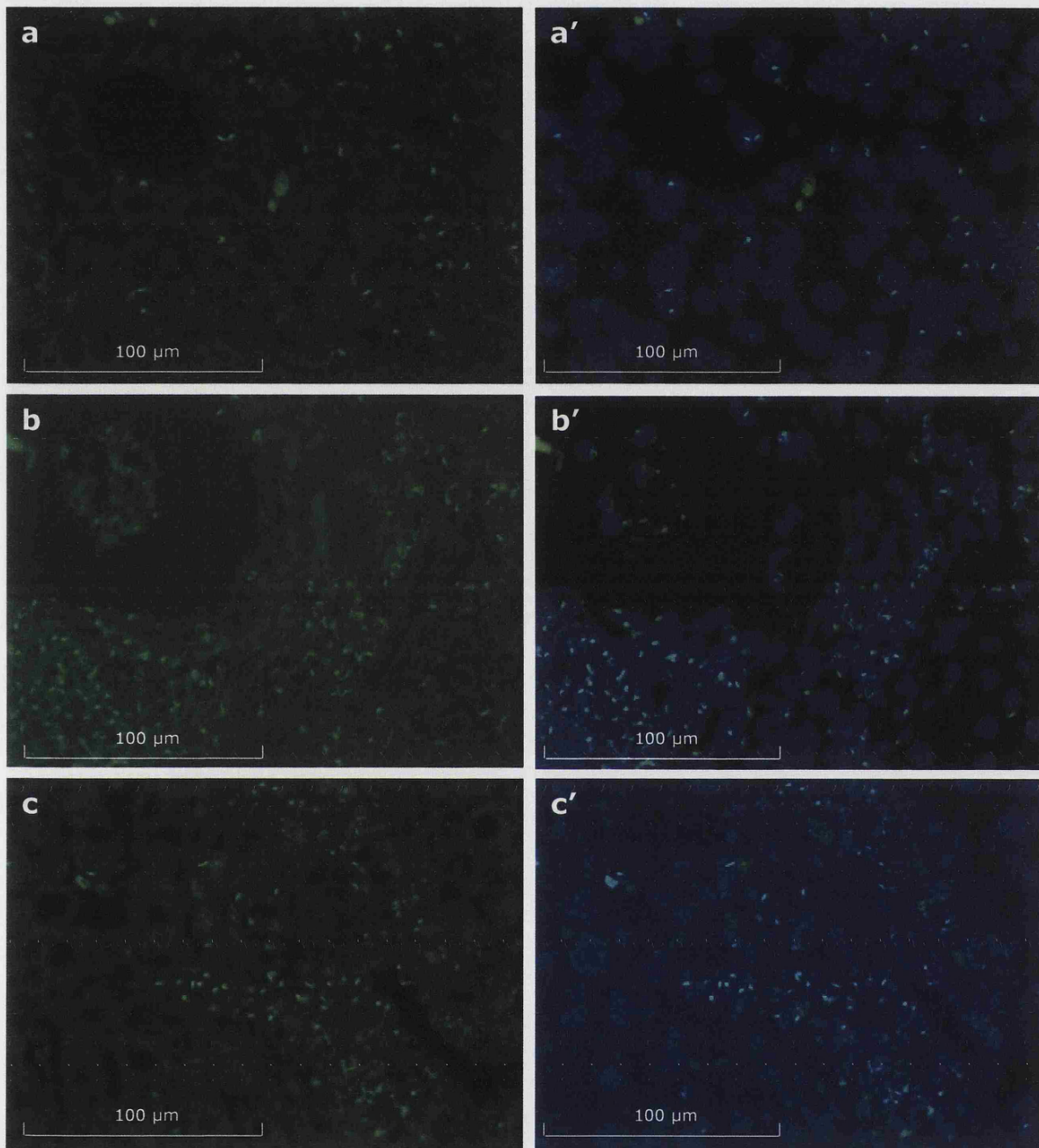


Figura 23. FISH para el cromosoma Y en hígado de ratones hembras *fch/fch* que recibieron un trasplante de médula ósea de ratones machos sanos. (a,b,c) Cromosomas Y marcados con FITC (verde). (a',b',c') Superposición de núcleos y señales de los cromosomas Y. (a') Cromosomas Y en zona centrolobulillar y en células del parénquima hepático. (b') Distribución periportal de células de origen donante. (c') Cromosomas Y en núcleos de menor tamaño.

2. F.5 Caracterización de las células de origen donante en el hígado de los animales receptores

Una vez comprobada la existencia de células de origen donante en el hígado de los animales que recibieron un trasplante de médula ósea y cuantificada la magnitud que tenía ese reclutamiento de células, caracterizamos su fenotipo. Esto permitiría evaluar su función en el hígado y ayudaría a comprender el alcance de la terapia celular con médula ósea.

El marcaje con un anticuerpo específico de albúmina nos permitió identificar células con fenotipo hepático. En todos los animales que recibieron una terapia celular localizamos células de origen donante que expresaban albúmina (Figura 26.a). El marcaje con este anticuerpo fue más extenso en los ratones del grupo TC4, mientras que en los grupos TC2 y TC3 se detectó menor número de células albúmina-positivas por campo. Como se refleja en la figura 25, la contribución de células de origen donante a la población de hepatocitos en los tres grupos de terapia celular fue de 11 ± 6 , 28 ± 6 y de $17 \pm 0,3$ en los grupos TC2, TC3 y TC4 respectivamente, calculado como número de células doble positivas (para albúmina y para cromosoma Y) referidas al número de células albúmina-positivas. Las diferencias observadas en estos porcentajes entre los tres grupos eran estadísticamente significativas. Esta proporción de células doble-positivas referida al número total de células hepáticas fue de 2% en el grupo TC2, 10% en el grupo TC3 y 8% en el grupo TC4.

También localizamos células de origen donante que expresaban α -sma, característico de miofibroblastos (células hepáticas estrelladas activadas) (Figura 26.b); estas células, productoras de colágeno, contribuyen a la reparación hepática a través de la fibrosis. En el hígado de ratones control sanos sólo se localizaron células α -sma-positivas asociadas a las paredes de los vasos (Figura 24.a), mientras que en los ratones control *fch/fch* se localizaron células inmunorreactivas para α -sma en zonas extensas alrededor del área portal (Figura 24.b) y en algunos casos, y coincidiendo con la tinción de Masson, formando puentes interportales.

De acuerdo con lo descrito en el estudio histológico (2.F.2), el grupo TC3 presentó mayor número de células marcadas con el anticuerpo anti- α -sma, cerca del 40% de las células hepáticas totales, aproximadamente el doble que en el grupo TC2. Sin embargo, la contribución relativa de las células de médula ósea a la población de miofibroblastos era igual en los grupos TC2 y TC3 y ligeramente

menor en el grupo TC4 (Figura 25). Referidas al número total de células del hígado, la contribución de la médula ósea a las células α -sma-positivas es de aproximadamente un 5% en el grupo TC2 y de un 12% en el grupo TC3.

En el grupo TC4 la mayoría de los miofibroblastos identificados mediante marcaje con anti- α -sma se encontraban revistiendo las paredes de vasos, de manera que el porcentaje de miofibroblastos que estarían localizados en zonas de fibrosis constituiría aproximadamente entre el 5% y el 10% de las células totales del hígado y un 2% de las células totales del hígado serían miofibroblastos que tendrían como origen la médula ósea sana trasplantada. Este porcentaje es significativamente menor que en los grupos TC2 y TC3.

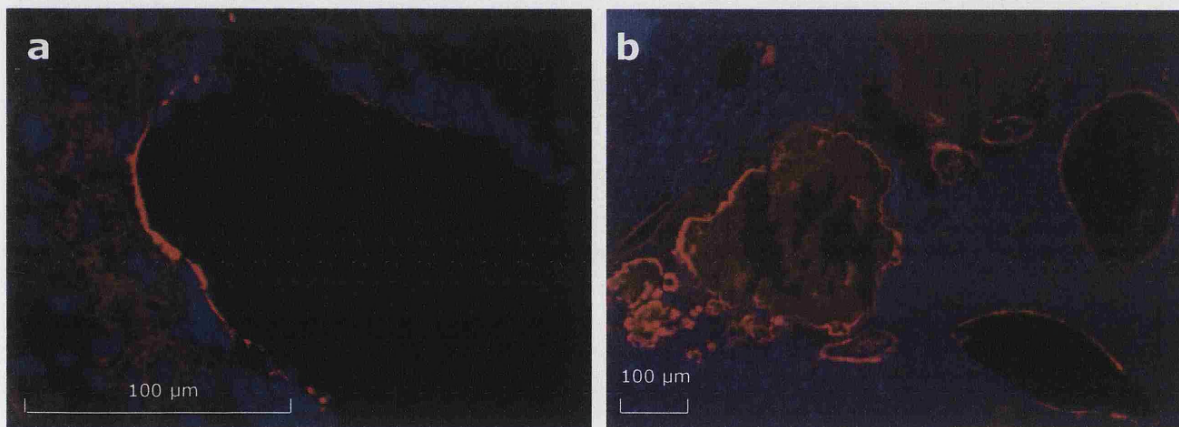


Figura 24. Marcaje inmunohistoquímico con α -sma (rojo). (a) Sección histológica del hígado de un ratón control sano; las células α -sma-positivas se limitan a las paredes de los vasos. (b) Sección histológica del hígado de un ratón *fch/fch*; marcaje extenso con α -sma en zona periportal. Núcleos contrateñidos con DAPI (azul).

La citoqueratina 19 (CK19) se expresa en células de los conductos biliares y también en células ovales; estas últimas son células progenitoras hepáticas que proliferan cuando existe daño hepático y la proliferación de los hepatocitos está comprometida. El uso de un anticuerpo específico para CK19 mostró un marcaje extenso en el hígado de los ratones receptores del trasplante de médula ósea, próximo al 50% de las células hepáticas en el grupo TC3. Las células que expresaban CK19 estaban localizadas fundamentalmente alrededor de los espacios porta y en los septos que se diferenciaban en los espacios de interfase entre lobulillos hepáticos, a modo de cordones de células con núcleo ovoide y escaso citoplasma. La colocalización con el marcaje para el cromosoma Y explicó el fenotipo de la fracción mayor de células de origen donante (Figura 27.a). Además,

las células de origen donante constituían hasta aproximadamente un 40% de la población de células CK19-positivas en el grupo TC3 (Figura 25).

El marcaje con CD45 nos sirvió para localizar células con fenotipo hematopoyético. Estas células de núcleo pequeño estaban concentradas mayoritariamente en las zonas próximas a los vasos (Figura 27.b) y en esta localización constituían aproximadamente el 10% de las células en los tres grupos. Las doble positivas para el anticuerpo anti-CD45 y para cromosoma Y constituían aproximadamente el 60% de las células CD45-positivas.

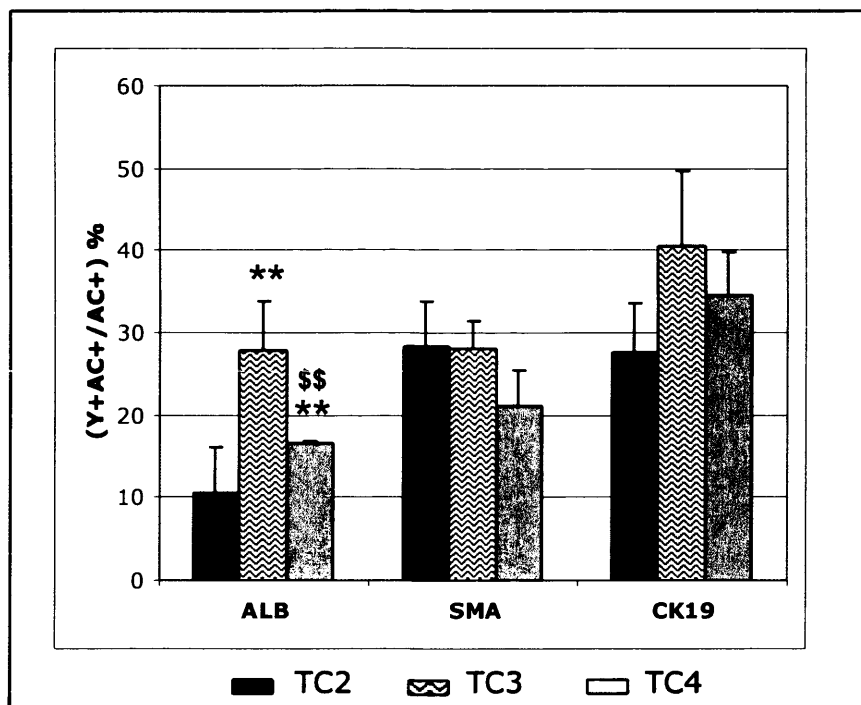


Figura 25. Porcentaje de células de origen donante (Y+) positivas para albúmina, α -sma y CK19, referidas al número total de células marcadas con el respectivo anticuerpo en hígado. ** diferencias significativas con TC2; \$\$ diferencias significativas con TC3.

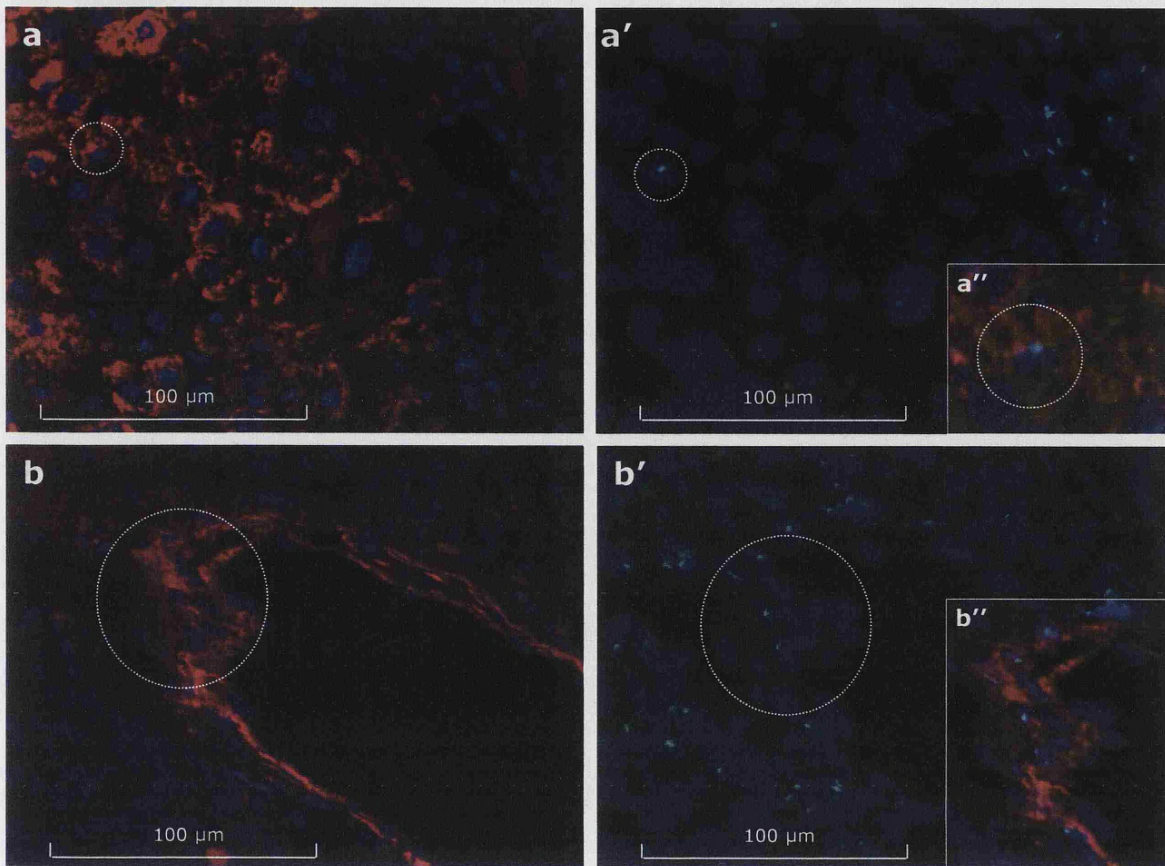


Figura 26. Marcaje inmunohistoquímico de albúmina (a), α -sma (b), en cortes de hígado de los ratones de terapia celular (núcleos: azul; anticuerpos: rojo). (a',b') FISH para el cromosoma Y en las mismas secciones en las que se realizó el marcaje inmunohistoquímico (núcleos: azul; cromosoma Y: verde). (a'',b'') Colocalización de células positivas para el respectivo anticuerpo y para el cromosoma Y.

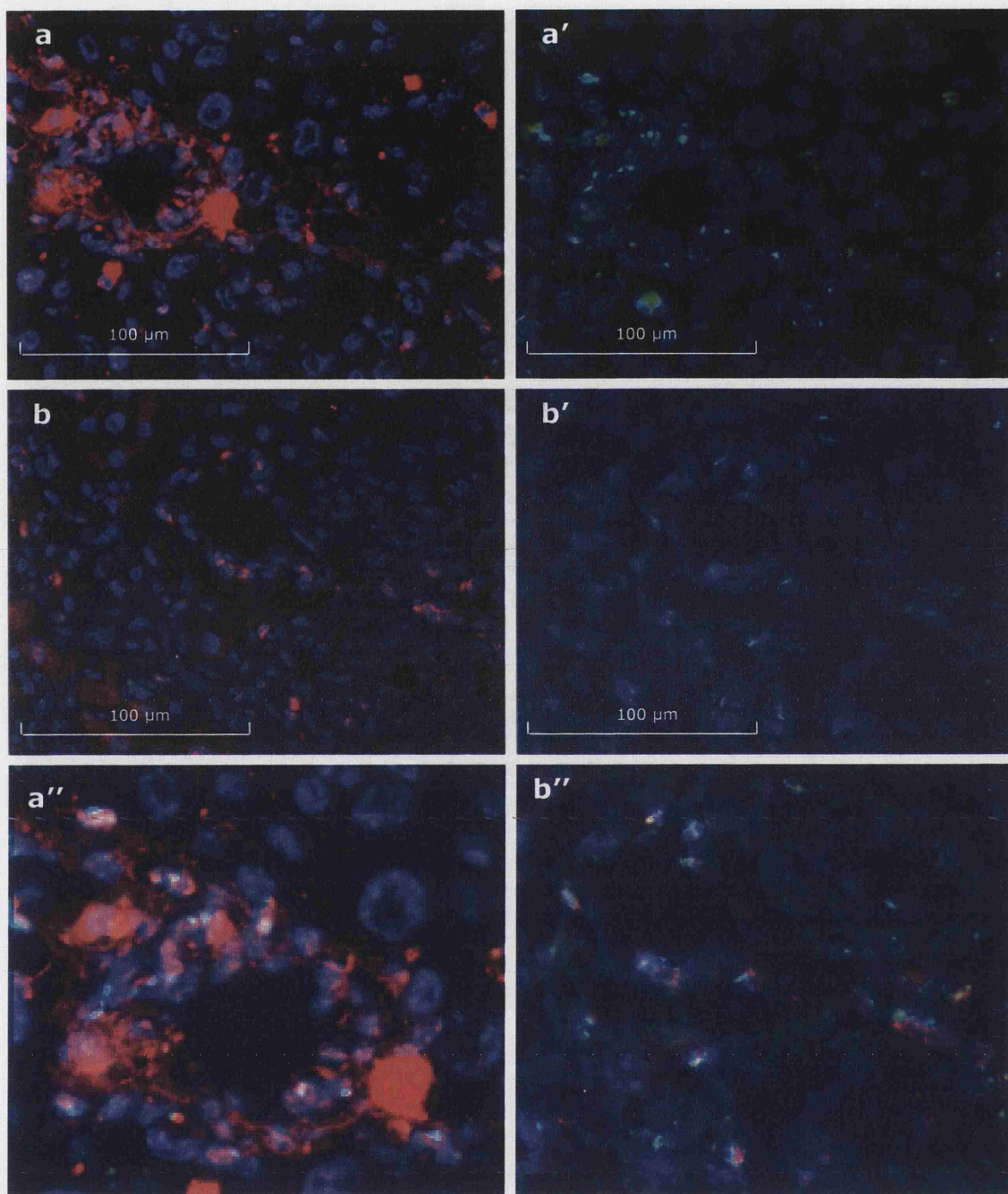


Figura 27. Marcaje inmunohistoquímico de CK19 (a), CD45 (b), en cortes de hígado de los ratones de terapia celular (núcleos: azul; anticuerpos: rojo). (a',b') FISH para el cromosoma Y en las mismas secciones en las que se realizó el marcaje inmunohistoquímico (núcleos: azul; cromosoma Y: verde). (a'',b'') Colocalización de células positivas para el respectivo anticuerpo y para el cromosoma Y.

DISCUSIÓN

MODELO ANIMAL $Fech^{m1Pas}/Fech^{m1Pas}$ 1

El desarrollo de modelos animales que reproducen parcial o totalmente enfermedades descritas en humanos constituye una herramienta útil para profundizar en el conocimiento de las consecuencias patofisiológicas del defecto genético en el organismo a nivel global, su etiología, su evolución y también en la optimización de las terapias existentes y en la elaboración de otras nuevas.

La PPE es una de las ocho enfermedades asociadas a alteraciones en la ruta de síntesis del grupo hemo denominadas porfirias y, aunque es una de las porfirias más frecuentes, tiene una incidencia estimada de 1 ó 2 de cada 10.000 habitantes; se engloba por tanto dentro de las calificadas como "enfermedades raras" (menos de 5 casos por cada 10.000 habitantes).

La sintomatología característica de esta enfermedad es la fotosensibilidad cutánea, presente en todos los pacientes con PPE, sin embargo, es la disfunción hepática la responsable del fenotipo más grave que aparece en el 5-10% de estos pacientes. La enfermedad hepática es la responsable de la mortalidad que se da entre los pacientes con PPE y habitualmente permanece silente hasta el momento en que las posibilidades de tratamiento se ven limitadas a realizar un trasplante de hígado.

Como se ha indicado en la introducción existen varios modelos animales que reproducen la sintomatología presente en los enfermos de PPE. Entre estos modelos el ratón $Fech^{m1Pas}/Fech^{m1Pas}$ es el único que presenta hepatopatía. La utilización de este modelo de PPE nos permite, por lo tanto, estudiar el tercer objetivo planteado en este trabajo: analizar la eficacia del trasplante de médula ósea sana en la prevención y/o reversión de la enfermedad hepática a medio y largo plazo.

La disfunción hepática que padecen estos animales incluye fibrosis portal y periportal, acumulación de protoporfirina en el parénquima hepático y en los conductos biliares e hiperplasia regenerativa. La edad de comienzo de la hepatopatía es muy temprana y, como se ha descrito en trabajos anteriores, el trasplante de médula ósea sana en animales jóvenes previene la progresión de la enfermedad hepática hasta etapas terminales y permite una cierta recuperación de la función hepática y el inicio del proceso de regeneración en el hígado (Fontanellas y cols., 2000).

En estas condiciones de daño hepático crónico e inicio de un proceso de regeneración nos encontramos con un modelo interesante para el estudio de la capacidad de reclutamiento de células madre de médula ósea sana desde el hígado de los animales enfermos y de su posible aportación a los diferentes tipos celulares del tejido receptor, de manera que puedan contribuir a la mejoría y/o recuperación del órgano en cuestión.

ALTERACIONES ERITROPOYÉTICAS 2

Todas las células eucariotas tienen la capacidad de sintetizar hemo debido a la presencia ubicua de la ferroquelatasa, sin embargo, la disminución en la actividad de la ferroquelatasa de los pacientes con PPE ocasiona la acumulación de grandes cantidades de protoporfirina en eritrocitos debido a que el metabolismo de las porfirinas es especialmente activo en los eritroblastos (Anderson y cols., 2001). La protoporfirina acumulada atraviesa, gracias a su liposolubilidad, la pared de los eritrocitos hacia el plasma y a esto se debe la fotosensibilidad grave que cursa con eritema, prurito, quemazón y edema en las zonas de la piel expuestas a la luz (Anderson y cols., 2001). Además, la capacidad del hígado disminuida para excretar la protoporfirina en la bilis contribuye al aumento de su concentración en plasma, además de en el hígado (Knobler y cols., 1989).

Cuando las porfirinas absorben luz entran en estado de excitación y liberan la energía en forma de fluorescencia roja o mediante la generación de especies de oxígeno reactivas que dañan los tejidos; se produce peroxidación de lípidos, oxidación de aminoácidos y entrecruzamientos de proteínas de la membrana celular (Sandberg & Romslo, 1981; Goldstein & Harber, 1972; de Goeij y cols., 1976). Todo esto ocasiona lesiones cutáneas mediadas por la fotoactivación del sistema de complemento, la liberación de histamina y factores quimiotácticos (Lim, 1989). Sin embargo, los mecanismos responsables de las alteraciones cutáneas propias de la PPE no se conocen del todo. El ratón PPE utilizado en este estudio reproduce esta vertiente clínica característica de la enfermedad en humanos.

En trabajos previos con el modelo murino de PPE se ha comprobado que, puesto que la protoporfirina se produce fundamentalmente en células eritroides, el trasplante de médula ósea en estos ratones es una terapia eficaz para disminuir su acumulación en glóbulos rojos y plasma. Esta disminución en la concentración de porfirinas se traduce en una corrección de la fotosensibilidad de los ratones trasplantados (Fontanellas y cols., 2001).

Después de realizar la terapia celular comprobamos si el injerto de la médula ósea sana había sido eficiente. Para ello cuantificamos el porcentaje de células de médula ósea de origen donante en los animales receptores; mediante la técnica de FISH se detectó un quimerismo alto, lo que significa que el trasplante fue correcto y la médula ósea donante tuvo un alto nivel de injerto en los animales receptores. Estos datos coinciden con lo publicado hasta ahora en terapia celular y génica con este modelo animal (Pawliuk y cols., 1999; Fontanellas y cols., 2000; Richard y cols., 2001).

El injerto correcto de la médula ósea donante tuvo como consecuencia una gran eficiencia terapéutica del trasplante, puesto que el análisis por citometría de flujo de las células sanguíneas circulantes de los ratones trasplantados mostró una distribución de fluorescencia similar a la de los ratones sanos control. Esta pérdida de fluorescencia, característica de los eritrocitos que acumulan grandes cantidades de protoporfirina, es consecuencia del aporte de médula ósea sana y de la eliminación, por irradiación, de la médula ósea con fenotipo porfírico. Estos resultados también reproducen lo observado por trabajos precedentes (Richard y cols., 2001; Pawliuk y cols., 2005).

2. A Normalización de las concentraciones de porfirinas en glóbulos rojos y plasma

Como se ha indicado anteriormente, el modelo murino de PPE utilizado en este estudio presenta fotosensibilidad cutánea similar a la que aparece en humanos; esta afectación cutánea es consecuencia de la hiperprotoporfirinemia. Para hacer un seguimiento de la terapia celular en términos de corrección metabólica se analizaron las concentraciones de protoporfirina en glóbulos rojos y en plasma a diferentes tiempos después del trasplante.

Hemos podido observar que en los 3 grupos de animales enfermos en los que se realizó la terapia celular (TC2, TC3 y TC4), la concentración de protoporfirina en glóbulos rojos se normalizó al cabo de 11 semanas después de recibir el trasplante de médula ósea. Igualmente observamos que la concentración de porfirinas en plasma se había reducido un 80% a las 3 semanas post-trasplante. Concretamente, en el grupo TC4 después de 18 semanas de trasplante la concentración de porfirinas en plasma era tan sólo el doble que en los controles sanos y aproximadamente un 2,5% de la observada en los controles enfermos (Tabla 1, Figura 14).

En los estudios de terapia celular y terapia génica realizados en este modelo animal se obtuvo también una normalización en la concentración de protoporfirina en glóbulos rojos; sin embargo en el presente trabajo se ha observado una disminución mayor en la concentración de porfirinas en plasma (1,5 veces valor normal) respecto a otros estudios (10 veces valor normal) (Pawliuk y cols., 1999; Fontanellas y cols., 2000). El hecho de que la concentración de porfirinas en plasma no se normalice completamente tras la terapia celular, aun cuando la corrección en eritrocitos es total, puede deberse a una posible contribución por parte del hígado que, en cualquier caso, sería mínima en comparación con la aportación eritroide.

Puesto que la fotosensibilidad cutánea, así como la disfunción hepática, son resultado de la acumulación de porfirinas derivadas mayoritariamente de la serie eritroide, podemos afirmar que, debido a la normalización de la concentración de protoporfirina en eritrocitos y la gran disminución de porfirinas en plasma obtenidas tras el trasplante de médula ósea sana, éste constituye una terapia eficiente y duradera para tratar la vertiente cutánea de la enfermedad.

2. B Corrección hematológica parcial tras el trasplante de médula ósea sana

En algunos pacientes con PPE se han descrito alteraciones hematológicas leves como anemia leve con hipocromía y microcitosis; la eritropoyesis no suele estar dañada y el metabolismo del hierro habitualmente es normal (Lyouni y cols., 2007).

En el modelo murino de protoporfiria eritropoyética se ha descrito anemia microcítica leve a partir de un mes de edad (Tutois y cols., 1991). Esta anemia parece estar producida por un acortamiento en la vida de los glóbulos rojos como consecuencia de la desorganización y destrucción de las membranas celulares producidas por el elevado potencial oxidativo de la protoporfirina.

La determinación de parámetros hematológicos en el grupo control enfermo ha confirmado estas alteraciones ya que, si bien el recuento de glóbulos rojos no mostraba diferencias estadísticamente significativas con un valor normal, la concentración de hemoglobina, el hematocrito y el VCM estaban disminuidos respecto a los animales sanos (Tabla 2).

En los grupos de animales que recibieron un trasplante terapéutico el recuento de eritrocitos no difería de los recuentos en animales sanos ni en animales enfermos, aunque permanecía algo inferior al de los primeros. Tampoco se revelaron diferencias estadísticamente significativas con el grupo de controles sanos en los valores de hematocrito y de VCM en el grupo TC2 y en el valor de hematocrito en el grupo TC3 (Tabla 2).

Sin embargo, después de recibir un trasplante de médula ósea sana y a pesar de que la concentración de protoporfirina en glóbulos rojos se ha normalizado y que por lo tanto han disminuido la toxicidad y posible lisis de glóbulos rojos, la concentración de hemoglobina continúa disminuida respecto a los controles sanos. Esto puede deberse a que, como se ha indicado, el recuento de glóbulos rojos es inferior al normal, aunque no tenga significación a nivel estadístico.

En trabajos anteriores con este modelo animal, tanto de terapia celular con médula ósea procedente de animales sanos como de terapia génica con médula ósea corregida, los resultados respecto a la recuperación hematológica de los animales receptores no son del todo homogéneos, a pesar de existir un elevado quimerismo en todos los casos (Fontanellas y cols., 2000; Fontanellas y cols., 2001). Esto nos podría indicar alguna susceptibilidad particular de este modelo animal de PPE a la metodología utilizada en los animales sometidos a irradiación letal previa al trasplante terapéutico de médula ósea que sería la causa de una incompleta restauración en el recuento de glóbulos rojos.

ALTERACIONES HEPÁTICAS 3

3.1 ALTERACIONES HEPÁTICAS. IMPLICACIONES DESDE EL PUNTO DE VISTA DE LA PPE

Las alteraciones hepáticas constituyen una vertiente característica de los pacientes con PPE y aparecen en aproximadamente un tercio de éstos, aunque dichas alteraciones son mayoritariamente leves y sólo en un 5-10% de los pacientes con PPE se desarrolla enfermedad hepática grave (Libbrecht y cols., 2003).

Se conoce que la acumulación de protoporfirina en el hígado es la causa principal de la hepatopatía cuando ésta aparece, aunque no se sabe con exactitud la contribución relativa de la médula ósea y del hígado a la cantidad de protoporfirina acumulada. La concentración de protoporfirina en sangre y heces antes y después de recibir un trasplante de hígado indica que los pacientes con PPE son heterogéneos respecto a la contribución hepática a la producción y acumulación de protoporfirina. En la mayoría de los pacientes el exceso de protoporfirina proviene de las células de médula ósea, pero hay pacientes en los que el hígado y la médula ósea contribuyen por igual y una minoría de pacientes en los que la sobreproducción de protoporfirina ocurre en el hígado (Lamon y cols., 1980).

Independientemente de su origen, en un principio la síntesis elevada de protoporfirina es la responsable de su acumulación en el hígado, puesto que debido a su hidrofobicidad la protoporfirina es excretada por la bilis. Cuando la capacidad de eliminación de la protoporfirina por la secreción biliar no es suficiente para

eliminar toda la protoporfirina que se produce, ésta se acumula, en parte, en forma de inclusiones cristalinas y llega a obstruir los conductos biliares pequeños, pudiéndose desarrollar cirrosis hepática de rápida progresión, sobre todo cuando existe colestasis asociada.

Como ya se ha indicado, el modelo murino de PPE utilizado en este trabajo reproduce como característica constante esta progresión de la enfermedad hepática más grave que presentan algunos pacientes con PPE.

Primeramente se discutirá sobre las consecuencias que la terapia celular con médula ósea sana realizada en los ratones PPE pueda tener sobre la mejoría y/o corrección de la disfunción hepática característica de esta enfermedad.

Seguidamente se tratará sobre la capacidad de reclutamiento por parte del hígado dañado de células de médula ósea y la contribución de las mismas a los diferentes procesos fisiopatológicos observados en el hígado tras la terapia celular. En este sentido se evaluará el efecto del factor estimulante de colonias de granulocitos, con capacidad para aumentar el número de células madre hematopoyéticas circulantes por movilización desde la médula ósea, sobre estos procesos fisiopatológicos.

3. A.1 Reducción significativa de porfirinas en el hígado nueve meses después del trasplante de médula ósea sana

Hemos indicado que la protoporfirina acumulada en el hígado, bien de origen eritroide o bien de origen hepático, es la causante de la hepatopatía. En el modelo murino *fch/fch* el exceso en la producción de protoporfirina proviene fundamentalmente del tejido eritroide, como ocurre en la mayoría de los humanos, por lo que un trasplante de hígado puede frenar la sobreproducción hepática de protoporfirina, si existe, y mejorar la excreción biliar de protoporfirina, pero al no corregir la deficiencia de la ferroquelatasa en médula ósea, el hígado trasplantado es susceptible de desarrollar daño de diversa gravedad como consecuencia de la producción de protoporfirina en el tejido eritroide. De esta forma, el trasplante de hígado debería ser considerado como una terapia sintomática con un alto grado de recurrencia de la enfermedad (Metselaar, 2007).

Debido a ésto, el trasplante de médula ósea se presenta, tal como se ha discutido en el apartado de "Alteraciones eritropoyéticas", como un tratamiento eficaz para disminuir la acumulación de protoporfirina en sangre. Cabe pensar, por lo tanto, que una normalización en la concentración de porfirinas en sangre pueda mermar su aportación eritroide al hígado y disminuir así su acumulación hepática.

Efectivamente la concentración de porfirinas en el hígado de los ratones enfermos trasplantados con médula ósea sana disminuyó significativamente en todos los grupos terapéuticos: se redujo un 20% y un 50% en los grupos sacrificados 3 meses después de recibir el trasplante, con (TC3) y sin tratamiento con G-CSF (TC2) y en el grupo sacrificado 9 meses después de la terapia (TC4) pasó a ser 11 veces menor respecto a los ratones control *fch/fch* (Tabla 3).

Estos resultados coinciden con lo observado en un trabajo anterior en el que se describió que, cuando el injerto se hacía en animales muy jóvenes, se revertía parcialmente la acumulación de protoporfirina en el hígado; esta acumulación se reducía 4 veces después de 6 meses de trasplante (Fontanellas y cols., 2000). La mayor reducción en la concentración de porfirinas en el hígado observada en el presente estudio en el grupo TC4 se debe seguramente a la mayor duración del período post-trasplante hasta el sacrificio del animal.

3. A. 2 *La actividad de la ferroquelatasa en hígado se duplica con la terapia celular*

La actividad de ferroquelatasa determinada en hígado de los ratones *fch/fch* fue aproximadamente un 10% de la actividad normal; este valor está de acuerdo con lo descrito para este modelo animal (Tutois y cols., 1991). En los animales de los grupos TC2 y TC3 la actividad de la ferroquelatasa en hígado no varió sustancialmente respecto a la actividad de los controles enfermos (Tabla 4).

Nueve meses después del trasplante con médula ósea sana la actividad de la ferroquelatasa hepática se duplicó respecto a la actividad de los animales enfermos, siendo este aumento significativo aunque muy alejado de una actividad normal (Tabla 4).

Al no existir corrección de la ferroquelatasa en el hígado no es esperable que su actividad hepática esté restaurada; sin embargo, la mejoría observada en esta actividad en el grupo TC4 podría deberse al aporte importante de células de origen donante al hígado, al que nos referiremos más adelante, y que podrían contribuir en cierto modo a una recuperación parcial de la actividad de la ferroquelatasa. En cualquier caso, un aumento tan moderado en la actividad de la ferroquelatasa hepática no tendría consecuencias en cuanto a corrección fisiológica.

3. A.3 *Recuperación parcial de la función hepática después de la terapia celular*

El análisis bioquímico de los parámetros séricos de funcionalidad hepática mostró alteraciones en los ratones *fch/fch*: elevación de transaminasas, de fosfatasa alcalina y de bilirrubina, indicadores de lesión hepática, colestasis biliar y disfunción hepática (Tablas 5 y 6, Figura 17).

Estos valores variaron en menor o mayor grado en los ratones que recibieron el trasplante terapéutico. La tendencia general en los tres grupos fue hacia la disminución en la concentración de transaminasas y de fosfatasa alcalina y, por lo tanto, reflejo de una reducción de la lisis de hepatocitos y de la retención biliar. Sin embargo, el grado de mejoría está en función de la duración del

trasplante y del tratamiento recibido (con o sin G-CSF). Mientras que en el grupo TC2 la tendencia a la normalización es clara, con una reducción del 40% y 35% en AST y ALT y de 35% en la fosfatasa alcalina a las 11 semanas post-trasplante, el grupo de animales que recibió el tratamiento con G-CSF no experimentó ninguna corrección en los valores de ALT y sí una mejoría, aunque menor, en los valores de AST y fosfatasa alcalina. En el grupo TC4, sacrificado 9 meses después del trasplante, se mantuvo la tendencia y los valores patológicos se recuperaron en mayor medida que en el grupo sacrificado 3 meses después del trasplante.

En los tres grupos la recuperación de la bilirrubina fue marcada desde la séptima semana después del trasplante, lo que es también indicativo del inicio del proceso de recuperación de la función hepática.

Estos datos bioquímicos están correlacionados con la histología del hígado, donde se apreció una concentración de protoporfirina mayor en el grupo TC3 y donde la tendencia a la normalización, acompañada de una disminución significativa del contenido de protoporfirina hepática, fue mayor en el grupo TC4 (Tabla 3).

Ya se describió en trabajos anteriores la relación existente entre la cantidad de pigmentación negra en el parénquima hepático y en la luz de los conductos biliares, la tendencia a la normalización de la arquitectura del tejido hepático y la reducción de los valores anormalmente elevados de los parámetros bioquímicos en este modelo animal tras una terapia celular con médula ósea (Fontanellas y cols., 2000).

3. A.4 *Papel protector de la citocromo C oxidasa frente a la citotoxicidad de la protoporfirina en los ratones jóvenes con PPE*

Los mecanismos moleculares en el gen de la ferroquelatasa explican la sobreproducción de protoporfirina y la fotosensibilidad cutánea que aparecen en todos los pacientes con PPE, pero no explican el fenotipo con daño hepático grave, ya que existe gran heterogeneidad genética entre los casos más graves. Y por lo tanto, debe haber otros factores implicados en la patogénesis y desarrollo del daño hepático grave.

Como se ha indicado, la ruta de excreción de la protoporfirina es biliar debido a su liposolubilidad (Plösch y cols., 2002) y en el modelo murino de PPE su producción incrementada lleva a una acumulación en el sistema biliar, que no es capaz de mantener el equilibrio entre producción-excreción. Meerman y colaboradores (1999) sugirieron que la proliferación de los conductos biliares y la fibrosis presente en estos animales son el resultado de la formación de bilis citotóxica con bajo contenido en lípidos y glutatión y concentración alta de protoporfirina, que podría causar citotoxicidad al epitelio biliar.

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio se constató un aumento en la actividad del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial inducido por la acumulación de protoporfirina. En el hígado de ratones PPE de fondo genético BALBC/cJ, en los que el contenido en protoporfirina está aumentado, se observó un incremento en la actividad de los complejos I, III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial y la ausencia de depleción de GSH, característico este último parámetro de daño citotóxico mantenido. El aumento de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial sugiere una mayor producción de ATP que estaría ligado a procesos de regeneración hepática y de neutralización del estrés oxidativo inducido por la acumulación de protoporfirina (Navarro y cols., 2005).

La falta de regulación de la cadena respiratoria mitocondrial podría ser pues uno de los factores implicados en la patogénesis y desarrollo del daño hepático grave.

En el presente estudio se caracterizó un incremento en la actividad del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial de los animales enfermos similar a lo descrito (Navarro y cols., 2005). En los cuatro grupos trasplantados se detectó un aumento significativo de esta actividad tras el trasplante de médula ósea. Esto implica que el procedimiento de irradiación y trasplante de médula ósea puede inducir la actividad estudiada por sí mismo, ya que el grupo control TC1 presenta valores de actividad del complejo IV por encima de los controles enfermos de su misma edad (Tabla 8).

Este incremento observado en los grupos de terapia celular a corto plazo (TC2 y TC3), de entre 2 y 4 veces respecto a los controles sanos, apoyaría la idea del mecanismo compensatorio para evitar el estrés oxidativo y de esta manera estaría contribuyendo a una menor gravedad del daño hepático; nuestra hipótesis se ve reforzada por la observación de una actividad de la citocromo C oxidasa más

inducida en el grupo TC2, donde las lesiones hepáticas son menos evidentes, que en el grupo TC3.

A los once meses de edad, la actividad de la citocromo C oxidasa está aumentada respecto a la de animales de 4 meses tanto en controles sanos como enfermos, lo que nos indica una inducción de la misma causada por la edad. También el grupo TC4, sacrificado 9 meses después del trasplante, exhibe una actividad similar a la de ambos grupos control de igual edad (Tabla 8).

Debido a los procesos de envejecimiento tiene lugar una excesiva producción de radicales libres en el organismo (Kasapoglu y Ozben, 2001) y podría ocurrir que el mecanismo protector que constituiría la inducción de la cadena respiratoria mitocondrial para neutralizar la citotoxicidad de la protoporfirina se saturara en edades avanzadas por este exceso de especies reactivas de oxígeno. En estas circunstancias, la acumulación excesiva de protoporfirina no aumentaría una ya inducida actividad del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial.

3. A.5 Marcadores tumorales y PPE

Como se indicó en la introducción, la prevalencia de hepatocarcinoma en pacientes con PPE es baja, aunque las alteraciones en el metabolismo del hemo favorecen la transformación neoplásica en el hígado humano (Fracanzani y cols., 2001).

En los ratones protoporfíricos se ha descrito el desarrollo de hepatocarcinoma en edad avanzada (Libbrecht y cols., 2003). Se han estudiado las concentraciones de cuatro marcadores tumorales, en homogenados de hígado, que habitualmente se examinan para detectar hepatocarcinoma y colangiocarcinoma.

Debido a que existen diferencias en las concentraciones de los marcadores tumorales estudiados entre los ratones control sanos y los ratones del grupo TC1 (hembras sanas irradiadas y trasplantadas con células de médula ósea de machos sanos), las diferencias observadas entre los grupos de terapia celular y sus correspondientes controles pierden significación biológica, por lo que hay que ser cauteloso a la hora de extraer conclusiones. Hemos estudiado las diferencias en las concentraciones de marcadores tumorales entre animales sanos y con PPE, ya que

los estudios previos sobre la formación de hepatocarcinoma en el modelo murino de PPE se hicieron a nivel de histología y no a nivel molecular de marcadores tumorales (Libbrecht y cols., 2003).

A los cuatro meses de edad no existen diferencias en las concentraciones de los cuatro marcadores tumorales estudiados entre los ratones sanos y los ratones *fch/fch*. Estos resultados son esperables puesto que el proceso de hepatocarcinogénesis en ratones PPE es un proceso a largo plazo que sólo conduce al hepatocarcinoma en edades avanzadas (Libbrecht y cols., 2003)

La concentración de TNF- α no estaba modificada en los ratones con PPE a los 11 meses de edad; esto podría deberse a que este marcador no aumenta de manera clara hasta que no hay un tumor. Sí se observaron diferencias en las concentraciones de AFP, CA19.9 y HGF entre los grupos control de 11 meses sanos y enfermos, siendo mayores las concentraciones de AFP y CA19.9 en los ratones con PPE y menor la concentración de HGF en dichos ratones.

Sin embargo, a pesar de que sí hay diferencias entre los animales sanos y con PPE de 11 meses, la información que aporta el marcador CA 19.9 es limitada debido a que su excreción es biliar. De modo que en estos ratones el aumento en la concentración de CA 19.9 que se observa en el hígado puede deberse en parte a la colestasis que sufren, ya que el CA 19.9 tendría dificultades para ser excretado por la obstrucción biliar y los resultados podrían estar distorsionados.

Más interesantes son los resultados de AFP; el aumento en el contenido de AFP en el hígado de los ratones con PPE de 11 meses es indicativo de un posible proceso de hepatocarcinogénesis y el hecho de que tras el trasplante de médula ósea su concentración disminuya un 40% respecto a los controles enfermos podría apuntar a una cierta reversión en dicho proceso de formación de hepatocarcinoma (Figura 18).

Aunque sabemos que estos últimos datos referentes a la terapia celular no pueden asegurarse debido a que el procedimiento del trasplante por sí mismo altera las concentraciones de los marcadores tumorales.

3. A.6 Reversión parcial de las alteraciones histológicas del hígado en ratones PPE trasplantados con médula ósea sana

Se realizó un estudio histopatológico del hígado en los ratones *fch/fch* y se encontró que este tejido presentaba fibrosis portal y periportal moderada. Aparecieron ocasionalmente focos de esteatosis y hepatocitos necrosados. Se encontraron depósitos de protoporfirina en los canalículos, en los conductos biliares y en las células de Kupffer. Estas características coinciden con lo descrito en trabajos previos sobre histopatología del hígado en este modelo murino de PPE (Abitbol y cols., 2005; Libbrecht y cols., 2003; Tutois y cols., 1991).

En estudios previos (Fontanellas y cols., 2000) se correlacionó la gravedad del daño hepatocelular y la pérdida de hepatocitos con la cantidad de depósitos de protoporfirina en el parénquima hepático y en los conductos biliares pequeños, ya que, cuando la producción de protoporfirina excede a la que se utiliza en la síntesis del hemo y a su tasa de excreción biliar máxima, se acumula progresivamente en eritrocitos, hígado y piel (Meerman y cols., 1999), siendo estos depósitos hepáticos responsables de la colestasis y de la hiperbilirrubinemia.

Nuestros resultados corroboran esta relación causa-efecto. La pigmentación negra observada en los cortes histológicos, correspondiente a los depósitos de protoporfirina, se redujo en todos los grupos de ratones enfermos que recibieron un trasplante de médula ósea sana, aunque esta disminución fue mayor en el grupo TC4. Estos resultados concuerdan con los datos bioquímicos correspondientes a cada grupo, ya que una mayor reducción en la concentración de protoporfirina en homogenados de hígado (Tabla 3) y una mayor recuperación de los parámetros séricos de función hepática (Tablas 5 y 6) se correlacionan con una mejoría más patente a nivel histológico y menor extensión de la fibrosis. Se ha descrito que la existencia de puentes de fibrosis porto-portales y porto-centrales, presentes en alguno de los animales que recibieron el trasplante, indica que la fibrosis tiene un origen mixto biliar y parenquimal (Libbrecht y cols., 2003). El descenso en la concentración hepática de protoporfirina en todos los grupos terapéuticos (TC2, TC3 y TC4) podría explicar la reducción de la fibrosis observada, ya que la bilis con alto contenido en protoporfirina puede producir por sí misma fibrosis hepática de origen biliar (Meerman y cols., 1999).

Al igual que ocurre en los pacientes con PPE y enfermedad hepática, se ha observado en este modelo murino una reacción ductular atípica en las zonas porta y en la interfase del lobulillo consistente en cadenas arbóreas de células ovales, inmunorreactivas para la citoqueratina 19 (Libbrecht y cols., 2003). La activación de las células ovales sería desencadenada por el daño y la pérdida de los hepatocitos o de las células epiteliales de los conductos biliares, características presentes en los ratones *fch/fch* debido, como se ha indicado anteriormente, a la formación de bilis citotóxica con alto contenido en protoporfirina. Esto explicaría la proliferación de conductos reactivos atípicos (Merman y cols., 1999). Esta reacción ductular atípica está presente también en los ratones que recibieron un trasplante de médula ósea terapéutico (TC2 y TC4) y es más profusa en el grupo de animales que recibió el tratamiento con G-CSF (TC3).

En el hígado de los ratones con PPE también hemos observado nódulos regenerativos definidos y delimitados por una red de colágeno, puesto de manifiesto con la tinción tricrómica de Masson. Estos nódulos aparecen en el parénquima hepático y están formados por hepatocitos de mayor tamaño que representan displasia celular grande, más frecuente en ratones de mayor edad. En las regiones periportales se observaron focos de displasia celular pequeña. El marcaje con citoqueratina 19 fue positivo mayoritariamente en las áreas periportales, coincidiendo con la distribución de los focos de células de menor tamaño definidos como displasia celular pequeña. Estas alteraciones coinciden con las descritas en trabajos anteriores donde se caracterizó que hasta un 50% de los focos con displasia celular pequeña eran células ovales (Libbrecht y cols., 2003).

En el grupo sacrificado nueve meses después del trasplante (TC4) se constató una reducción de la fibrosis, que fue más difusa que en los animales control *fch/fch* y que en los grupos TC2 y TC3. La estructura del parénquima presentó un aspecto normal, sin la presencia de nódulos regenerativos, si bien, también se observó cierta reacción ductular atípica en las zonas portales aunque con menor extensión que en los otros grupos. Ya en trabajos con terapia celular en este modelo murino de PPE (Fontanellas y cols., 2000) se describieron una menor presencia y menor definición de los nódulos regenerativos en el hígado de ratones receptores de médula ósea sana.

En su estudio histopatológico del hígado de ratones con PPE, Libbrecht y colaboradores (2003) describieron hepatocarcinogénesis y el papel que jugaba en este proceso la aparición de displasia celular pequeña y displasia celular grande

como sucesos tempranos en el desarrollo tumoral. Relacionaron la displasia celular pequeña con la presencia de células ovasales y con un posible papel en la hepatocarcinogénesis, ya que observaron una mayor inmunorreactividad para citoqueratina 19 en los hepatocarcinomas encontrados en los ratones enfermos que en el parénquima circundante. Sin embargo, la displasia celular grande representaría el proceso que conduce los hepatocitos hacia la senescencia y regeneración por daño hepatocelular persistente.

El hecho de que el grupo de terapia celular sacrificado nueve meses después del trasplante presente menor extensión de proliferación de células positivas para el marcaje con citoqueratina 19 y menor presencia de nódulos regenerativos está relacionado con una disminución en la concentración de AFP medida en homogenado de hígados y esto podría indicar cierta reversión o prevención en el proceso de hepatocarcinogénesis a largo plazo.

En cualquier caso, el trasplante de médula ósea sana en ratones *fch/fch* genera una serie de cambios en las características histológicas del hígado de los animales receptores. Estos cambios apuntan a una mejoría del tejido hepático reflejada en una disminución de los acúmulos de protoporfirina, disminución en extensión e intensidad de la fibrosis y menor frecuencia de nódulos regenerativos y se correlacionan con los datos bioquímicos de función hepática y de concentraciones de porfirinas en glóbulos rojos, plasma e hígado.

3. B CONTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS DONANTES DE MÉBULA ÓSEA A LA FISIOPATOLOGÍA HEPÁTICA DEL RATÓN CON PPE

3. B.1 *Plasticidad celular y daño hepático*

El único tratamiento que existe en la actualidad para el fallo hepático terminal es el trasplante alogénico de hígado, pero su uso está muy condicionado por la disponibilidad limitada de órganos donantes. De las otras alternativas al trasplante hepático de órgano la que actualmente se considera más prometedora es el trasplante celular con hepatocitos. Sin embargo, aunque únicamente del 3-10% de hepatocitos funcionales puede ser suficiente para conseguir una mejoría clínica apreciable de la salud del paciente, todavía es necesario adecuar las técnicas actuales para incrementar el rendimiento y la calidad de los hepatocitos obtenidos (Taléns-Visconti y cols., 2006).

Una buena alternativa para el trasplante celular sería la utilización de células troncales adultas, con la doble capacidad de dividirse ilimitadamente y de dar lugar a diferentes tipos de células especializadas. Las células troncales adultas están presentes en tejidos u órganos adultos debido a que en el proceso de desarrollo normal de un organismo adulto tiene lugar un proceso continuado de división celular para mantener constante el número de células diferenciadas de determinados tejidos que están sometidos a un proceso de desgaste natural causado por el envejecimiento, daño, enfermedad o muerte celular. Estas células madre adultas tendrían una capacidad pluripotencial que, en función del medio en que se sitúen, podrían diferenciarse hacia células de diferentes linajes.

Entre las células madre adultas, las células progenitoras hepáticas tienen una gran capacidad para proliferar y dar lugar a hepatocitos maduros pero aún no existe una forma eficiente para purificarlas y conseguir un número suficiente de ellas.

Recientemente se han realizado numerosos trabajos sobre plasticidad celular, entendida esta plasticidad como la capacidad de las células madre adultas,

bajo determinadas condiciones microambientales, de diferenciarse en células de tejidos distintos de aquél con el cual la célula madre se encuentra aparentemente comprometida (Taléns-Visconti y cols., 2006). En este proceso de conversión la célula pierde marcadores específicos de su funcionalidad original y adquiere marcadores y funciones relacionadas con su nuevo linaje.

La capacidad de determinadas células madre adultas para originar células de otro linaje amplía las posibilidades de estas células a la hora de utilizarlas con fines terapéuticos. La mayoría de los tejidos contienen probablemente células madre adultas y, en este sentido, las células troncales más accesibles y mejor estudiadas son las del sistema sanguíneo debido a la sencillez en la recolección de las muestras y al procedimiento de aislamiento celular, además de la versatilidad de las células obtenidas de médula ósea para reparar tejidos dañados de muy diversas estirpes (Taléns-Visconti y cols., 2006).

Existen numerosos estudios que describen la capacidad de las células de médula ósea total o bien de células madre hematopoyéticas o de células madre mesenquimales para producir distintos tipos celulares: de hueso, de cartílago, de pulmón, neurales, cardíacas, adipocitos y hepatocitos en animales irradiados y no irradiados (Pereira y cols., 1995; Theise y cols., 2000; Lagasse y cols., 2001; Krause y cols., 2001; Tholpady y cols., 2003; Airey y cols., 2004).

Se conocen muchos factores solubles diferentes capaces de regular la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas. Algunos de estos factores pueden aumentar el número de células madre hematopoyéticas circulantes por movilización desde la médula ósea, como el factor estimulante de colonias de granulocitos (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) (Liu y cols., 2006; Quintana-Bustamante y cols., 2006). Se ha descrito que el G-CSF aumenta la regeneración hepática en modelos animales cuando los hepatocitos ya están estimulados y son sensibles a los factores de crecimiento, bien por hepatectomía parcial o bien por daño hepático inducido químicamente (Theocharis y cols., 1999). El G-CSF probablemente actúa sobre otras citoquinas conocidas modulando la expresión de factores de crecimiento o de proto-oncogenes (Theocharis y cols., 1999).

Se ha observado que cuando se administra G-CSF tras realizar un trasplante de hígado aumenta la función hepática y que el G-CSF estimula la movilización de las células madre hematopoyéticas hacia la circulación y su diferenciación a

hepatocitos a través del injerto de células ovas hepáticas y colangiocitos. De esta manera, las células madre hematopoyéticas podrían entrar en el hígado en el área del tracto portal y en las áreas de necrosis (Liu y cols., 2006). Este incremento en la regeneración hepática favorecida por G-CSF se ha descrito también en otros trabajos en los que se realizó un trasplante de médula ósea en un modelo de daño hepático causado por CCl₄ (Quintana-Bustamante y cols., 2006). La movilización de células madre con G-CSF es, por tanto, una terapia potencial para incrementar la regeneración hepática debido a su facilidad de tratamiento y a la universalidad de su aplicación (Liu y cols., 2006).

Sin embargo, para que las células madre de médula ósea manifiesten esta plasticidad celular y puedan originar células de linaje hepático, es necesaria la existencia de daño hepático, de forma que el ambiente genere una serie de señales capaces de reclutar las células desde la médula ósea (Quintana-Bustamante y cols., 2006).

3. B.1.A Interés del modelo murino de PPE para el estudio de procesos de plasticidad celular

La denominación de terapia celular hace referencia al empleo de células con fines terapéuticos, de modo que su finalidad es sustituir o reparar la función de las células o tejidos lesionados y consiste en trasplantar células individuales a un órgano receptor en cantidades suficientes para que sobrevivan y restauren la función normal.

Se ha descrito que mediante el trasplante de médula ósea en el modelo murino *Fech^{m1Pas}/Fech^{m1Pas}* se consigue una reversión de la manifestación cutánea de la enfermedad debida a la corrección de las alteraciones eritropoyéticas presentes en la PPE (Fontanellas y cols., 2000). En el presente trabajo se ha observado dicha corrección y, puesto que la médula ósea es uno de los dos tejidos principalmente afectados, el reemplazo de la médula ósea deficiente por otra médula ósea sana implica en sí mismo una terapia celular para la PPE. Además, este trasplante de médula ósea sana en los ratones con PPE inicia el proceso de regeneración hepática y, como se indicó anteriormente, uno de los objetivos de este estudio es comprobar si dicho proceso regenerativo permite reclutar células madre de la médula ósea de manera que contribuyan a mejorar la función hepática.

Los modelos experimentales disponibles actualmente para el estudio sobre la contribución de las células hepáticas progenitoras o de otras células progenitoras a la regeneración hepática son diversos: daño hepático causado por hepatectomía parcial, hepatotoxinas químicas varias, irradiación, dietas tóxicas, generación de transgénicos (ratón deficiente para fumaril acetoacetato hidroxilasa); si bien, no todos estos modelos presentan alteraciones patológicas equivalentes a las encontradas en hígados humanos (Kofman y cols., 2005).

El ratón *fch/fch* presenta hepatopatía similar a la descrita en humanos desde las pocas semanas de edad, lo que lo convierte en un modelo de enfermedad hepática crónica de sumo interés para el estudio de la posible contribución de las células madre de médula ósea a la recuperación de la función hepática.

3. B.2 *La médula ósea donante contribuye a la reparación hepática en el modelo murino de PPE*

Existe un interés creciente en la dinámica de la patogénesis de la cirrosis hepática debido a que se ha detectado su posible reversión parcial en determinados modelos animales y en humanos (Forbes y cols., 2004). La cirrosis puede ser definida como la última consecuencia de la fibrosis en el parénquima hepático que resulta en la formación de nódulos y en una arquitectura y función hepáticas alteradas. La fibrosis y la cirrosis son las consecuencias de una respuesta para reparar una herida sostenida producida por daño hepático crónico debido a diversas causas: virales, autoinmunes, inducidas por drogas, colestasis, enfermedades metabólicas, etc (Friedman, 2003).

Los miofibroblastos son células ampliamente distribuidas en el organismo con características de fibroblastos y de células de músculo liso. Son células importantes que tienen una gran influencia en su ambiente debido a los receptores que poseen y a las señales celulares que producen. Están implicadas en crecimiento, diferenciación, desarrollo y reparación durante la respuesta inflamatoria. Tienen la capacidad de producir matriz extracelular y la sobreactivación de miofibroblastos está implicada en las enfermedades fibróticas, entre ellas, la fibrosis hepática (Forbes y cols., 2004).

Existen diversos trabajos en los que se estudia el origen de los miofibroblastos detectados en el hígado tras daño hepático y trasplante con células de médula ósea o bien en casos de trasplante hepático en los que aparecen miofibroblastos de origen extrahepático (Forbes y cols., 2004; Kisseleva y cols., 2006; Russo y cols., 2006).

Para estudiar si después del trasplante de médula ósea en nuestro modelo de PPE existía reclutamiento de células de origen donante que contribuyera a la fibrosis hepática, se evaluó la presencia de miofibroblastos de origen de médula ósea en los hígados de los ratones de los grupos de terapia celular. En los ratones control sanos de este estudio solamente se localizaron miofibroblastos (células α -sma-positivas) asociados a vasos hepáticos, lo que coincide con la distribución esperada en un hígado sano (Russo y cols., 2006). En los ratones *fch/fch* y en los grupos TC2 y TC3 se detectaron zonas inmunorreactivas para α -sma extensas, principalmente en áreas portales y en algunos casos rodeando los nódulos hepáticos. Esta distribución es coincidente con la observada mediante tinción con tricrómico de Masson.

Existen trabajos en los que se ha concluido que después de un trasplante hepático una proporción importante de miofibroblastos son de origen receptor y provienen de una fuente circulante. Estos miofibroblastos circulantes no reemplazarían completamente a los miofibroblastos que se originan de la activación de células hepáticas estrelladas, sino que existiría un equilibrio dinámico entre las fuentes de miofibroblastos intrahepática y circulante en cada individuo, siendo importante la aportación intrahepática en el desarrollo de la fibrosis (Forbes y cols., 2004).

La proporción de miofibroblastos de origen donante observada en el hígado de nuestros ratones con PPE después del trasplante de médula ósea está en torno a 20-25% del número total de miofibroblastos en los tres grupos de terapia celular. En otros trabajos se ha descrito hasta un 70% de miofibroblastos que proceden de la médula ósea después de producir daño hepático con CCl_4 y tioacetamida (TAA); este porcentaje desciende hasta un 16% cuando existe un período de recuperación después del daño hepático (Russo y cols., 2006).

En los experimentos mencionados el origen de las células hepáticas estrelladas y miofibroblastos que aparecen en el hígado y que son de origen donante se ha caracterizado y se ha comprobado que provienen de células madre

mesenquimales, ya que según las células trasplantadas estén enriquecidas en células madre mesenquimales o hematopoyéticas el porcentaje de miofibroblastos de origen donante es de 53% u 8% respectivamente (Russo y cols., 2006). Esto podría explicar el hecho de que nosotros observemos en los grupos TC2 y TC3, (sin y con tratamiento con G-CSF), porcentajes similares en cuanto a miofibroblastos de origen donante, referidos al total de miofibroblastos, a pesar de que en el grupo TC3 se ha aumentado el número de progenitores hematopoyéticos circulantes (Figura 25).

Kisseleva y colaboradores (2006) han hecho otra aproximación para estudiar la contribución de la médula ósea a la fibrosis hepática: mediante trasplante de médula ósea de un ratón transgénico que expresa la GFP bajo un promotor de colágeno y al que producen daño hepático por ligadura de conductos biliares, detectan entre 5% y 10% de células donantes productoras de colágeno referidas a la población de células que contribuyen a la fibrosis. Estas células de origen donante causantes de fibrosis, denominadas fibrocitos, son una población diferente a la que describimos en este trabajo, puesto que expresan CD45 y producen colágeno pero no expresan α -sma (Kisseleva y cols., 2006).

El tipo de daño hepático es determinante a la hora de explicar la magnitud de la contribución de la médula ósea a la fibrosis hepática. Por ejemplo, la ligadura de los conductos biliares produce un daño hepático similar a la fibrosis gradual que aparece en la enfermedad hepática crónica y en ese caso dicha contribución sería escasa (Kisseleva y cols., 2006).

En nuestro trabajo no hemos identificado el mecanismo por el que las células de médula ósea donante originan miofibroblastos en el hígado de los animales receptores. Se ha descrito transición o diferenciación de fibrocitos a miofibroblastos en un caso, en pulmón (Kisseleva y cols., 2006), aunque no sería un proceso de transdiferenciación puesto que los fibrocitos en la médula ósea ya estarían determinados a producir colágeno (Kisseleva y cols., 2006). En otros trabajos sobre tumores pancreáticos se describe aproximadamente un 25% de miofibroblastos de origen donante en el borde de los tumores y estos miofibroblastos serían resultado de un mecanismo de fusión con las células del tejido receptor (Direkze y cols., 2004).

Después de nueve meses de trasplante el análisis histológico de los ratones del grupo TC4 reveló un tejido parcialmente recuperado y el análisis

inmunohistoquímico con el anticuerpo α -sma mostró menor presencia de células que contribuían a la fibrosis hepática; sin embargo, el aporte relativo de células de origen de médula ósea donante a la fibrosis hepática no se modificó significativamente respecto a los grupos TC2 (sacrificados tres meses después del trasplante) y TC3 (sacrificados tres meses después del trasplante y tratados con G-CSF), aunque fue algo menor (Figura 25). Esto indica que el aporte de la médula ósea al proceso de reparación hepática no se vería modificado por la magnitud de esta reparación.

3. B.3 *La médula ósea donante contribuye a la regeneración hepática en el modelo murino de PPE*

3. B.3. A Contribución de la médula ósea a los progenitores hepáticos en el modelo murino de PPE

El proceso de regeneración hepática es la respuesta del hígado al daño tisular. El hígado tiene una gran capacidad de autorregenerarse mediante crecimiento compensatorio, pero en condiciones normales es un órgano con un grado de proliferación relativamente bajo. En el proceso regenerativo del hígado contribuyen todas las células maduras remanentes en el hígado. Además de hepatocitos y células no parenquimales, el hígado contiene células troncales intrahepáticas que pueden generar células precursoras denominadas ovas. Todas las células proliferan para restablecer el tejido perdido, pero la velocidad de su respuesta es diferente y depende de la naturaleza del daño hepático; normalmente la replicación de los hepatocitos existentes es el camino más rápido y eficiente para restablecer la capacidad funcional del hígado en un proceso de regeneración y de reparación hepática (Fausto, 2004). En este sentido el hígado es un órgano diferente a otros, como pueden ser la piel y el epitelio intestinal, puesto que las células madre intrahepáticas constituyen un compartimento proliferativo secundario mientras que las células completamente diferenciadas pueden proliferar fácilmente (Fausto y Campbell, 2003; Taléns-Visconti y cols., 2006).

Las denominadas células ovas expresan marcadores tanto de hepatocitos fetales como de colangiocitos y son capaces de producir estos dos tipos celulares. Estas células ovas constituyen un compartimento transitorio de células progenitoras hepáticas; son una población "amplificadora" transitoria derivada de una población de células madre aún no bien caracterizadas, que se piensa que está

situada en el canal de Hering (Forbes y Alison, 2006). Las células ovals son inmunorreactivas también para anticuerpos que se han asociado clásicamente a linajes hematopoyéticos, aunque no se sabe con certeza si esto se debe a que existe un origen común entre ambos tipos celulares o a que estos marcadores son expresados por todas las células madre independientemente de su origen (Fausto y Campbell, 2003).

Las células ovals normalmente se replican y diferencian a hepatocitos sólo cuando la replicación de hepatocitos adultos está enteramente bloqueada (Fausto, 2004). Se utiliza el término de activación de células progenitoras hepáticas o células ovals para designar el proceso por el que aumenta el número de células progenitoras y tiene lugar su diferenciación hacia línea hepática y/o biliar (Roskams y cols., 2004). En modelos animales donde se ha producido hepatectomía parcial seguida de daño químico las células ovals proliferan hasta llegar a constituir más del 50% de las células del hígado (Fausto y Campbell, 2003).

Esta activación y proliferación de células ovals se ha descrito en el modelo murino de PPE, en el que se detectó la presencia de células ovals organizadas en estructuras ductulares arborizadas; esta proliferación de células ovals se denomina reacción ductular atípica (Libbrecht y cols., 2003). En el presente trabajo hemos detectado dicha reacción oval en los tres grupos terapéuticos, siendo mayor en el grupo TC3 (sacrificados tres meses después del trasplante y tratados con G-CSF), donde constituye hasta cerca del 50% de las células hepáticas.

La localización de estas células ovals en el hígado de los ratones que recibieron el trasplante de médula ósea sana era mayoritariamente portal y en algunos individuos del grupo TC3 esta localización se extendía a las zonas de interfase entre los lobulillos. Las células ovals aparecían siempre próximas a las áreas donde se localizaban las células α -sma-positivas o miofibroblastos.

Para algunos autores la localización periductular o intraportal de las células ovals es consistente con la hipótesis de que algunas de éstas podrían originarse de fuentes extrahepáticas, como por ejemplo de médula ósea (Petersen y cols., 1999). Por ello, se han realizado estudios en los que, mediante diversos protocolos de daño hepático, sus autores buscaban determinar si era posible que las células ovals fueran originadas a partir de médula ósea. Menthen y colaboradores (2004), después de someter a los animales a tres modelos de daño hepático y activación y expansión de las células ovals (D-galactosamina,

retrosina/hepatectomía parcial y 2-acetilaminoflureno (2-AAF)/hepatectomía parcial), concluyen que únicamente el 1% de las células ovasales tendrían su origen en la médula ósea; por lo que las células ovasales provendrían casi exclusivamente de progenitores hepáticos endógenos.

En el presente trabajo hemos detectado un porcentaje considerable de células ovasales, CK19-positivas, cuyo origen era la médula ósea, como lo prueba el hecho de que se detectó el cromosoma Y hasta en un 40% de las células ovasales del grupo TC3 (Figura 25). Esto nos indica que una parte importante de las células de médula ósea reclutadas por el hígado en el ratón *fch/fch* se derivan a la formación de progenitores hepáticos y, por lo tanto, contribuye al proceso de regeneración hepática a través de la denominada reacción ductular atípica.

Recientemente se ha realizado un estudio en el que se detectó un porcentaje elevado de células ovasales con origen en la médula ósea en ratas sometidas a trasplante de médula ósea y diversos tratamientos de activación de células ovasales (Oh y cols., 2007). Hasta un 20% de las células ovasales coexpresaban marcadores donantes y los autores explican cómo en el caso de que las células ovasales endógenas estén inhibidas, una segunda población de células ovasales procedentes de la médula ósea llegaría al hígado y contribuiría a la regeneración hepática.

Sin embargo, se conocen determinados datos acerca de la posible implicación de las células ovasales en procesos de hepatocarcinogénesis que complican la interpretación del significado fisiológico global que pueda tener esta contribución importante de las células de médula ósea donante a la regeneración hepática.

Se ha sugerido recientemente que el carcinoma hepatocelular podría estar originado por la transdiferenciación de células de médula ósea. El carcinoma hepatocelular podría originarse a diferentes niveles dentro de la diferenciación del linaje de células madre hepáticas (Wu y Chen, 2006). Se piensa que hay un riesgo incrementado de carcinogénesis en aquellos procesos en los que los hepatocitos se derivan de células ovasales. Una de las causas sería que el número excesivo de ciclos de replicación necesarios para la transición célula oval/hepatocito incrementaría el riesgo de que se produjeran variaciones genéticas en los hepatocitos formados de esta manera (Fausto y Campbell, 2003). Por otra parte, no se ha establecido si los hepatocitos derivados de las células ovasales son inmaduros, anormales o si tienen alto riesgo de transformación.

Además, se ha observado que en un modelo murino de cáncer pancreático la médula ósea podría contribuir al ambiente tumoral también mediante una aportación importante a la población de miofibroblastos, aunque no se sabe si la médula ósea contribuye al estroma del tumor como un mecanismo de defensa del huésped o si es reflejo del reclutamiento de células por parte de los tumores (Direkze y cols., 2004). En un modelo murino de metástasis hepática se observó que los miofibroblastos se infiltraban en las micrometástasis y producían crecimiento endotelial vascular y, por lo tanto, jugaban un papel pro-angiogénico (Forbes y cols., 2004).

Desde hace mucho tiempo se ha asociado el cáncer con el daño tisular crónico, de manera que el crecimiento canceroso podría representar un proceso continuo de reparación tisular 'des-regulada'. La transformación maligna de los hepatocitos podría ocurrir en un contexto de inflamación crónica y regeneración. Además, algunos autores proponen que el carcinoma hepatocelular poco diferenciado podría estar originado a partir de células madre de médula ósea y de células ovasales y el carcinoma hepatocelular bien diferenciado se originaría a partir de hepatocitos maduros (Wu y Chen, 2006).

3. B.3. B Un porcentaje significativo de hepatocitos provienen de la médula ósea donante en los ratones con PPE trasplantados

Como hemos indicado anteriormente, el hígado tiene la capacidad de autorregenerarse y en condiciones normales la manera en la que tiene lugar esta regeneración hepática es a través de la proliferación de los hepatocitos (Fausto, 2004).

En el modelo murino *fch/fch* utilizado en este trabajo, la capacidad de proliferación de los hepatocitos se encuentra limitada por la acción citotóxica de la bilis rica en protoporfirina y por la acumulación de dicha protoporfirina en el parénquima hepático. Por este motivo, se puede observar en el ratón con PPE la activación y proliferación de las células ovasales como principal mecanismo conducente a la regeneración hepática.

Sin embargo, aunque ésta parece ser la vía predominante de regeneración hepática en este modelo experimental, en este trabajo se ha detectado un porcentaje significativo de hepatocitos originados a partir de la médula ósea después del trasplante terapéutico.

En los últimos años se han realizado numerosos trabajos cuyo objetivo era dilucidar si células madre de médula ósea trasplantadas tenían la capacidad de generar hepatocitos en hígados normales de ratones y en la mayoría de los modelos de daño hepático. En una gran parte de estos estudios los resultados muestran a lo sumo un 0,05% de hepatocitos de origen donante, respecto a los hepatocitos totales. En una minoría de trabajos este porcentaje supera el 1,5% y sólo en el modelo murino *fah*^{-/-} (fumarylacetoacetate hydrolase protein) se ha obtenido un porcentaje importante de hepatocitos derivados de médula ósea, donde después de realizar un trasplante de médula ósea más del 30% de los hepatocitos eran de origen donante (Thorgeirsson y Grisham, 2006). En este último modelo experimental la elevada proporción de hepatocitos con origen en la médula ósea era resultado de la amplificación del pequeño porcentaje de células de origen donante injertadas inicialmente; dicha amplificación era consecuencia de la ventaja selectiva que presentaban las células de origen donante respecto a las células del animal receptor cuando se le suministraba una droga hepatotóxica (Wang y cols., 2003).

Una de las conclusiones más inmediatas que se deducen de los trabajos que se han realizado y se siguen realizando en el campo de la plasticidad celular es que las células de médula ósea son una fuente importante de células no parenquimales, como las células de Kupffer y células endoteliales, y que el papel de la médula ósea en la generación de estas células dentro del proceso de regeneración hepática es más significativa que la generación de hepatocitos (Fausto, 2004).

Por estas razones, diversos autores concluyen que la formación de hepatocitos a partir de células donantes de médula ósea es un proceso ineficiente debido a que contribuyen mínimamente a la formación de hepatocitos bajo condiciones fisiológicas o patológicas, aunque sí pueden proporcionar citoquinas y factores de crecimiento que promuevan la función hepática mediante mecanismos paracrinos (Thorgeirsson y Grisham, 2006).

En contraste con estos porcentajes de hepatocitos donantes publicados y, a excepción del modelo de tirosinemia (Wang y cols., 2003), en nuestro trabajo con

el modelo murino *fch/fch* se ha obtenido un porcentaje importante de hepatocitos de origen donante después del trasplante de médula ósea sana. En el grupo TC2, sacrificados tres meses después del trasplante de médula ósea, cerca del 10% de los hepatocitos examinados (reactivos frente al anticuerpo anti-albúmina) eran cromosoma Y-positivos (Figura 25), lo que constituía un 2% de las células totales del hígado. Este porcentaje aumentó significativamente con el tratamiento con G-CSF (TC3), llegando a un 27% de hepatocitos de origen donante, referidos al número total de hepatocitos examinados (Figura 25) y casi un 10% de las células totales hepáticas.

Este aumento en la contribución medular a la formación de células que expresan albúmina en el grupo TC3 indica un efecto positivo del tratamiento con el factor movilizador de células madre hematopoyéticas en el proceso de regeneración hepática mediante formación de hepatocitos.

Nueve meses después del trasplante de médula ósea (TC4), la proporción de hepatocitos que eran de origen donante había aumentado desde el 10% (TC2) hasta el 17% y, puesto que el parénquima hepático en este grupo terapéutico ocupaba mayor superficie que en los otros 2 grupos (TC2 y TC3), la contribución de estas células de origen donante y con fenotipo de hepatocito representaba el 8% del total de las células hepáticas.

Una de las razones que pueden explicar la gran variación que existe entre los resultados obtenidos en este trabajo y los resultados publicados hasta ahora, también altamente heterogéneos, es la utilización de diferentes técnicas para la identificación de las células de origen donante.

En los trabajos donde se emplean técnicas de hibridación *in situ* para la detección de cromosomas sexuales con el fin de discriminar entre las células del animal donante y las células del animal receptor, se han obtenido, en general, porcentajes mayores de implantación de células de origen medular que en aquellos trabajos en los que se ha utilizado, por ejemplo, la expresión de GFP (*green fluorescent protein*). A esto hay que añadir la utilización de factores de corrección en algunos trabajos debido a la imposibilidad de examinar la superficie completa del núcleo o la no utilización de microscopía confocal para evitar asignar señales de cromosoma Y a núcleos de células endoteliales o Kupffer que están superpuestas a los hepatocitos (Fausto, 2004).

Otro factor que condiciona los resultados observados en cuanto al fenómeno de plasticidad celular es el tipo de daño hepático del modelo utilizado y el tipo de células trasplantadas. Se ha comprobado que las células madre mesenquimales pueden diferenciarse a células similares a hepatocitos maduros que nunca expresan genes específicos hepáticos tempranos, mientras que las células madre hematopoyéticas tienen una tendencia a diferenciarse a células troncales hepáticas, con una expresión creciente de AFP y una señal decreciente de albúmina (Taléns-Visconti y cols., 2006). Estos resultados indican que se podría modular el efecto de un trasplante de médula ósea seleccionando el tipo de células que se trasplantaran.

Por último, se conoce que las células hematopoyéticas y las células hepáticas no parenquimatosas derivadas de las células hematopoyéticas contribuyen al mantenimiento y al reemplazo de los hepatocitos por mecanismos indirectos que no implican la transformación directa en hepatocitos, mediante la producción de citoquinas y factores de crecimiento que mantienen la diferenciación y el crecimiento de los hepatocitos durante la embriogénesis y regulan la proliferación y la función de los hepatocitos en adultos (Thorgeirsson y Grisham, 2006). Por lo tanto, es necesario separar los efectos del trasplante de células hematopoyéticas que están mediados por factores de crecimiento y citoquinas secretados por las células trasplantadas y su progenie de células hepáticas no parenquimales de otros efectos que son dependientes de la transformación de células hematopoyéticas en hepatocitos (Thorgeirsson y Grisham, 2006).

En cualquier caso, en el modelo murino de PPE hemos detectado un porcentaje elevado de células originadas de la médula ósea donante implantadas en el hígado de los animales receptores. Estas células de origen donante contribuyen a los procesos de reparación y regeneración hepática mediante la contribución de miofibroblastos, hepatocitos y células ovales.

Considerando los datos que relacionan la proliferación de células ovales con procesos de hepatocarcinogénesis y, puesto que en el modelo murino de PPE la médula ósea contribuye de manera significativa a la formación de células ovales en el hígado, sería necesario investigar la evolución de estas células ovales y su implicación en la regeneración hepática y su posible papel en la formación de hepatomas.

Sin embargo, hay que considerar que en nuestro estudio el trasplante de médula ósea se realizó en ratones con ocho semanas de edad, a diferencia de trabajos anteriores en los que los animales sólo tenían entre tres y cuatro semanas de edad (Fontanellas y cols., 2000); esto implicaría que en el momento de recibir el trasplante de médula ósea la enfermedad hepática estaría en una fase más avanzada y, por lo tanto, la proliferación de los hepatocitos estaría comprometida, de manera que se favorecería el proceso de regeneración hepática a través de la proliferación de células ovas. De manera que, dada la importante contribución de la médula ósea en este modelo animal a otros tipos celulares como los hepatocitos, y para asegurar que el trasplante de médula ósea no sólo revierte las alteraciones eritropoyéticas, sino que también previene las hepáticas, sería conveniente realizar el trasplante de médula ósea antes de que el daño hepático sea tan extenso, cuando el parénquima hepático aún está en condiciones de iniciar el proceso de regeneración hepática sin la necesidad de recurrir a los progenitores hepáticos.

COROLARIO DE RESULTADOS

1. El trasplante de médula ósea sana en ratones *fch/fch* evita la sobreproducción de protoporfirina en la línea eritroide y como consecuencia se normaliza la concentración de porfirinas en plasma.
2. La normalización en las concentraciones de porfirinas en glóbulos rojos y en plasma debida al trasplante de médula ósea sana tiene como consecuencia una disminución en la acumulación hepática de protoporfirina.
3. La disminución en la concentración de porfirinas en sangre y en hígado está correlacionada con una mejoría en la estructura histológica del hígado y todo esto promueve una recuperación de la función hepática. Esta mejoría es mayor después de nueve meses de trasplante.
4. Una mayor actividad de la citocromo C oxidasa está correlacionada con una mejoría hepática a nivel histológico y funcional en ratones jóvenes *fch/fch* y de los grupos de terapia celular a corto plazo.
5. Nueve meses después del trasplante de médula ósea sana la concentración de alfa-fetoproteína se redujo considerablemente y esta disminución se correlaciona con una mejoría de la estructura y función hepáticas.
6. El tratamiento con G-CSF conlleva una mayor presencia de células productoras de fibrosis hepática en los animales receptores de médula ósea sana.
7. Las células de médula ósea donante contribuyen a la población hepática de miofibroblastos. Esta contribución es similar en los tres grupos de terapia celular y parece independiente de la extensión de la fibrosis.
8. La mayoría de las células de origen donante reclutadas por el hígado contribuyen a la población de células ovas y, por lo tanto, al proceso de regeneración hepática. Esto sugiere que la proliferación de células ovas endógenas está bloqueada, lo que favorece el reclutamiento de células madre de médula ósea que contribuyen a la reacción oval.

9. Se observa en este modelo murino de PPE un elevado porcentaje de hepatocitos originados a partir de células de médula ósea donante. Esto indica que la proliferación de hepatocitos endógenos puede estar inhibida o muy comprometida, posiblemente debido al efecto tóxico de la protoporfirina en el hígado.
10. La administración de G-CSF incrementa el anidamiento de células de médula ósea donante en el hígado y su diferenciación a hepatocitos. Sin embargo, ni los parámetros séricos de función hepática ni el análisis histológico del hígado de los ratones que recibieron el tratamiento con G-CSF, reflejan un efecto terapéutico de este mayor reclutamiento cuando se compara con los ratones que no recibieron dicho tratamiento y con la misma duración del trasplante.
11. Existe un claro anidamiento de células madre de médula ósea donante en los animales receptores y estas células persisten en su nuevo nicho nueve meses después del trasplante.
12. A pesar del reclutamiento importante de células madre de médula ósea sana desde el hígado, la recuperación hepática de los animales *fch/fch* trasplantados es parcial. Esto puede deberse a que la concentración de protoporfirina en el hígado, aunque disminuída, continúa siendo lo suficientemente elevada como para producir hepatotoxicidad y seguir promoviendo la reparación y la regeneración hepáticas.
13. En este sentido, el trasplante de médula ósea sana en ratones *fch/fch* a una edad más temprana podría traducirse en una mayor prevención y/o mejoría de la función hepática.

CONCLUSIONES

- ∞ El trasplante con médula ósea sana en ratones *fch/fch* constituye una terapia celular adecuada para revertir las alteraciones eritropoyéticas presentes en este modelo. Como consecuencia de la disminución de la síntesis eritroide de protoporfirina, su concentración hepática decrece, lo que conduce a una mejoría en la estructura y función del hígado.

- ∞ Existe un reclutamiento importante de células de médula ósea desde el hígado de los animales receptores. Estas células de médula ósea contribuyen a la reparación del tejido hepático, mediante mecanismos de fibrogénesis, y a la regeneración hepática, a través de la formación de progenitores hepáticos y hepatocitos.

BIBLIOGRAFÍA

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

1. Abitbol M, Bernex F, Puy H, Jouault H, Deybach JC, Guenet JL & Montagnetelli X. A mouse model provides evidence that genetic background modulates anemia and liver injury in erythropoietic protoporphyria. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005; 288: G1208-G1216.
2. Airey JA, Almeida-Porada G, Colletti EJ, Porada CD, Chamberlain J, Movsesian M, Sutko JL & Zanjani ED. Human mesenchymal stem cells form Purkinje fibers in fetal sheep heart. *Circulation*. 2004; 109: 1401-1407.
3. Ajioka RS, Phillips JD & Kushner JP. Biosynthesis of heme in mammals. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1763: 723-736.
4. Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J & Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*. 2000; 406:257.
5. Al-Karadaghi S, Hansson M, Nikonov S, Jonsson B & Hederstedt L. Crystal structure of ferrochelatase: the terminal enzyme in heme biosynthesis. *Structure*. 1997; 5: 1501-1510.
6. Anderson PM & Desnick RJ. Purification and properties of delta-aminolevulinate dehydrase from human erythrocytes. *J Biol Chem*. 1979; 254: 6924- 6930.
7. Anderson KE, Sassa S, Bishop DF & Desnick RJ. Disorders of heme biosynthesis: X-linked sideroblastic anemia and the porphyrias. En: The metabolic and molecular bases of inherited diseases. Scriver CR, Beaudet al, Sly WS, Valle E. (eds). Mc Graw Hill. New York. 2001: 2991-3062.
8. Astrin KH, Warner CA, Yoo HW, Goodfellow PJ, Tsai SF & Desnick RJ. Regional assignment of the human uroporphyrinogen III synthase (UROS) gene to chromosome 10 q25.2- q26.3. *Hum Genet*. 1991; 87: 18-22.
9. Avner DL, Lee RG & Berenson MM. Protoporphyrin-induced cholestasis in the isolated *in situ* perfused rat liver. *J Clin Invest*. 1981; 67: 385-394.
10. Benten D, Kumaran V, Joseph B, Schattenberg J, Popov Y, Schuppan D & Gupta S. Hepatocyte transplantation activates hepatic stellate cells with beneficial modulation of cell engraftment in the rat. *Hepatology*. 2005; 42: 1072-1081.
11. Bloomer JR, Phillips MJ, Davidson DL, Klatskin G & Bloomer J. Hepatic disease in erythropoietic protoporphyria. *Am J Med*. 1975; 58: 869-882.

12. Bonkovsky HL & Schned AR. Fatal liver failure in protoporphyria. Synergism between ethanol excess and the genetic defect. *Gastroenterology*. 1986; 90: 191-201.
13. Bonkowsky HL, Bloomer JR, Ebert PS & Mahoney MJ. Heme synthetase deficiency in human protoporphyria. Demonstration of the defect in liver and cultured skin fibroblasts. *J Clin Invest*. 1975; 56: 1139-1148.
14. Bopp C, Bakos L & da Graca Busko M. Erythropoietic protoporphyria. *Int J Biochem*. 1980; 12: 909-913.
15. Bottomley SS, Tanaka M & Everett MA. Diminished erythroid ferrochelatase activity in protoporphyria. *J Lab Clin Med*. 1975; 86: 126-131.
16. Boulechfar S, Lamoril J, Montagutelli X, Guenet JL, Deybach JC, Nordmann Y, Dailey H, Grandchamp B & de Verneuil H. Ferrochelatase structural mutant (Fechm1Pas) in the house mouse. *Genomics*. 1993; 16: 645-648.
17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-254.
18. Brun A, Steen H & Sandberg S. Erythropoietic protoporphyria: two populations of reticulocytes, with and without protoporphyrin. *Eur J Clin Invest*. 1996; 26: 270-278.
19. Burden AE, Wu C, Dailey TA, Busch JL, Dhawan IK, Rose JP, Wang B & Dailey HA. Human ferrochelatase: crystallization, characterization of the [2Fe-2S] cluster and determination that the enzyme is a homodimer. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1435: 191-197.
20. Camadro JM, Ibrahim NG & Levere RD. Kinetic studies of human liver ferrochelatase. Role of endogenous metals. *J Biol Chem*. 1984; 259: 5678-5682.
21. Camadro JM & Labbe P. Purification and properties of ferrochelatase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a precursor form of the protein. *J Biol Chem*. 1988; 263: 11675-11682.
22. Chen FP, Risheg H, Liu Y & Bloomer J. Ferrochelatase gene mutations in erythropoietic protoporphyria: focus on liver disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2002; 48: 83-89.
23. Chenais B, Molle I, Trentesaux C & Jeannesson P. Time-course of butyric acid-induced differentiation in human K562 leukemic cell line: rapid increase in gamma-

- globin, porphobilinogen deaminase and NF-E2 mRNA levels. *Leukemia*. 1997; 11: 1575-1579.
24. Childs S, Weinstein BM, Mohideen MA, Donohue S, Bonkovsky H & Fishman MC. Zebrafish dracula encodes ferrochelatase and its mutation provides a model for erythropoietic protoporphyria. *Curr Biol*. 2000; 10: 1001-1004.
25. Chowdhury JR, Wolkoff AW & Arias IM. Hereditary jaundice and disorders of bilirubin metabolism. En: The metabolic basis of inherited disease. Schriver C, Beaudet A, Sly W, Valle, D, Stanbury J, Wyngaardeen J, Fredicson D (eds). McGraw-Hill. New York 1989. 53: 1367-1408.
26. Chretien S, Dubart A, Beaupain D, Raich N, Grandchamp B, Rosa J, Goossens M & Romeo PH. Alternative transcription and splicing of the human porphobilinogen deaminase gene result either in tissue-specific or in housekeeping expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85: 6-10.
27. Cotter PD, Baumann M & Bishop DF. Enzymatic defect in "X-linked" sideroblastic anemia: molecular evidence for erythroid delta-aminolevulinate synthase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89: 4028-4032.
28. Dailey HA Jr & Lascelles J. Ferrochelatase activity in wild-type and mutant strains of *Spirillum itersonii*. Solubilization with chaotropic reagents. *Arch Biochem Biophys*. 1974; 160: 523-529.
29. Dailey HA, Finnegan MG & Johnson MK. Human ferrochelatase is an iron-sulfur protein. *Biochemistry*. 1994; 33: 403-407.
30. Dailey HA, Dailey TA, Wu CK, Medlock AE, Wang KF, Rose JP & Wang BC. Ferrochelatase at the millennium: structures, mechanisms and [2Fe-2S] clusters. *Cell Mol Life Sci*. 2000; 57: 1909-1926.
31. De Goeij AF, van Straalen RJ & van Steveninck J. Photodynamic modification of proteins in human red blood cell membranes, induced by protoporphyrin. *Clin Chim Acta*. 1976; 71: 485-494.
32. De Leo VA, Poh-Fitzpatrick M, Mathews-Roth M & Harber LC. Erythropoietic protoporphyria. 10 years experience. *Am J Med*. 1976; 60: 8-22.
33. De Matteis F & Gibbs AH. Stimulation of the pathway of porphyrin synthesis in the liver of rats and mice by griseofulvin, 3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine and related drugs: evidence for two basically different mechanisms. *Biochem J*. 1975; 146: 285-287.

34. Delfau-Larue MH, Martasek P & Grandchamp B. Coproporphyrinogen oxidase: gene organization and description of a mutation leading to exon 6 skipping. *Hum Mol Genet.* 1994; 3: 1325-1330.
35. Direkze NC, Hoidalva-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulosom R, Oukrif D, Alison MR & Wright NA. Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Res.* 2004; 64:8492-8495.
36. Doss M, von Tiepermann R, Schneider J & Schmid H. New type of hepatic porphyria with porphobilinogen synthase defect and intermittent acute clinical manifestation. *Klin Wochenschr.* 1979; 57: 1123.
37. Dubart A, Mattei MG, Raich N, Beaupain D, Romeo PH, Mattei JF & Goossens M. Assignment of human uroporphyrinogen decarboxylase (URO-D) to the p34 band of chromosome 1. *Hum Genet.* 1986; 73: 277-279.
38. Eales L. Liver involvement in erythropoietic protoporphyria (EP). *Int J Biochem.* 1980; 12: 915-923.
39. Elder GH, Evans JO & Thomas N. The primary enzyme defect in hereditary coproporphyria. *Lancet.* 1976; 2: 1217-1219.
40. Enríquez de Salamanca R, Sepulveda P, Morán MJ, Santos JL, Fontanellas A & Hernández A. Clinical utility of fluorometric scanning of plasma porphyrins for the diagnosis and typing of porphyrias. *Clin Exp Dermatol.* 1993; 18: 128-30.
41. Fang TC, Alison MR, Wright NA & Poulosom R. Adult stem cell plasticity: will engineered tissues be rejected? *Int J Exp Pathol.* 2004; 85: 115-124.
42. Fausto N & Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev.* 2003; 120: 117-130.
43. Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology.* 2004; 39: 1477-1487.
44. Ferreira GC, Franco R, Lloyd SG, Moura I, Moura JJ & Huynh BH. Structure and function of ferrocyclase. *J Bioenerg Biomembr.* 1995; 27: 221-229.
45. Filmus J & Capurro M. Glypican-3 and alphafetoprotein as diagnostic tests for hepatocellular carcinoma. *Mol Diagn.* 2004; 8: 207-212.

46. Fontanellas A, Mazurier F, Landry M, Taine L, Morel C, Larou M, Daniel JY, Montagutelli X, de Salamanca RE & de Verneuil H. Reversion of hepatobiliary alterations by bone marrow transplantation in a murine model of erythropoietic protoporphyria. *Hepatology*. 2000; 32: 73-81.
47. Fontanellas A, Méndez M, Mazurier F, Cario-Andre M, Navarro S, Ged C, Taine L, Geronimi F, Richard E, Moreau-Gaudry F, Enríquez De Salamanca R & de Verneuil H. Successful therapeutic effect in a mouse model of erythropoietic protoporphyria by partial genetic correction and fluorescence-based selection of hematopoietic cells. *Gene Ther*. 2001; 8: 618-626.
48. Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Rugge M, Wright NA & Alison MR. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2004; 126: 955-963.
49. Forbes SJ & Alison MR. Side population cells: taking center stage in regeneration and liver cancer? *Hepatology*. 2006; 44: 23-26.
50. Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter BV & Strom SC. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1998; 338: 1422-1426.
51. Fracanzani AL, Taioli E, Sampietro M, Fatta E, Bertelli C, Fiorelli G & Fargion S. Liver cancer risk is increased in patients with porphyria cutanea tarda in comparison to matched control patients with chronic liver disease. *J Hepatol*. 2001; 35: 498-503.
52. Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol*. 2003; 38: S38-S53.
53. Gardner LC, Smith SJ & Cox TM. Biosynthesis of delta-aminolevulinic acid and the regulation of heme formation by immature erythroid cells in man. *J Biol Chem*. 1991; 266: 22010-22018.
54. Goerz G, Krieg T, Bolsen K, Seubert S & Ippen H. Erythropoietic protoporphyria: porphyrin content of a gall-stone. *Arch Dermatol Res*. 1976; 256: 283-289.
55. Goldstein BD & Harber LC. Erythropoietic protoporphyria: lipid peroxidation and red cell membrane damage associated with photohemolysis. *J Clin Invest*. 1972; 51: 892-902.
56. Goodwin RG, Kell WJ, Laidler P, Long CC, Whatley SD, McKinley M, Badminton MN, Burnett AK, Williams GT & Elder GH. Photosensitivity and acute liver injury in myeloproliferative disorder secondary to late-onset protoporphyria caused by deletion of a ferrochelatase gene in hematopoietic cells. *Blood*. 2006; 107: 60-62.

57. Gouya L, Deybach JC, Lamoril J, Da Silva V, Beaumont C, Grandchamp B & Nordmann Y. Modulation of the phenotype in dominant erythropoietic protoporphyria by a low expression of the normal ferrochelatase allele. *Am J Hum Genet.* 1996; 58: 292-299.
58. Gouya L, Puy H, Lamoril J, Da Silva V, Grandchamp B, Nordmann Y & Deybach JC. Inheritance in erythropoietic protoporphyria: a common wild-type ferrochelatase allelic variant with low expression accounts for clinical manifestation. *Blood.* 1999; 93: 2105-2110.
59. Gouya L, Puy H, Robreau AM, Lyoumi S, Lamoril J, Da Silva V, Grandchamp B & Deybach JC. Modulation of penetrance by the wild-type allele in dominantly inherited erythropoietic protoporphyria and acute hepatic porphyrias. *Hum Genet.* 2004; 114: 256-262.
60. Grandchamp B, Deybach JC, Grelier M, de Verneuil H & Nordmann Y. Studies of porphyrin synthesis in fibroblasts of patients with congenital erythropoietic porphyria and one patient with homozygous coproporphyria. *Biochim Biophys Acta.* 1980; 629: 577-586.
61. Harbin BM & Dailey HA. Orientation of ferrochelatase in bovine liver mitochondria. *Biochemistry.* 1985; 24: 366-370.
62. Human Gene Mutation Database: www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php.
63. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN): Nomenclature of tetrapyrroles: Recommendations 1978. *Eur. J. Biochem.* 1980. 108: 1.
64. Jordan PM, Nordlov H, Burton G & Scott AI. A rapid direct assay for uroporphyrinogen III cosynthetase. *FEBS Lett.* 1980; 115: 269-272.
65. Jordan PM & Laghai-Newton A. Purification of 5-aminolevulinate synthase. *Methods Enzymol.* 1986; 123: 435-443.
66. Kappas A, Sassa S, Galbraith RA & Nordman Y. The porphyrias. En: The metabolic and molecular bases of inherited diseases. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Stanbury JB, Wyngaarden JB, Frederickson DS. (eds). Mc Graw Hill. New York. 1995: 2103.
67. Karr SR & Dailey HA. The synthesis of murine ferrochelatase in vitro and in vivo. *Biochem J.* 1988; 254: 799-803.

68. Kasapoglu M & Ozben T. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Exp Gerontol*. 2001; 36: 209-220.
69. Kaya AH, Plewinska M, Wong DM, Desnick RJ & Wetmur JG. Human delta-aminolevulinate dehydratase (ALAD) gene: structure and alternative splicing of the erythroid and housekeeping mRNAs. *Genomics*. 1994; 19: 242-248.
70. Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, Quintana-Bustamante O, Segovia JC, Schwabe RF & Brenner DA. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol*. 2006; 45: 429-438.
71. Knobler E, Poh-Fitzpatrick MB, Kravetz D, Vincent WR, Muller-Eberhard U & Vincent SH. Interaction of hemopexin, albumin and liver fatty acid-binding protein with protoporphyrin. *Hepatology*. 1989; 10: 995-997.
72. Kofman AV, Morgan G, Kirschenbaum A, Osbeck J, Hussain M, Swenson S & Theise ND. Dose- and time-dependent oval cell reaction in acetaminophen-induced murine liver injury. *Hepatology*. 2005; 41: 1252-1261.
73. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S & Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001; 105: 369-377.
74. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL & Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*. 2000; 6: 1229-1234.
75. Lamon JM, Poh-Fitzpatrick MB & Lamola AA. Hepatic protoporphyrin production in human protoporphyria. Effects of intravenous hematin and analysis of erythrocyte protoporphyrin distribution. *Gastroenterology*. 1980; 79: 115-125.
76. Lamoril J, Boulechfar S, de Verneuil H, Grandchamp B, Nordmann Y & Deybach JC. Human erythropoietic protoporphyria: two point mutations in the ferrochelatase gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; 181: 594-599.
77. Libbrecht L, Meerman L, Kuipers F, Roskams T, Desmet V & Jansen P. Liver pathology and hepatocarcinogenesis in a long-term mouse model of erythropoietic protoporphyria. *J Pathol*. 2003; 199: 191-200.
78. Lim HW. Mechanisms of phototoxicity in porphyria cutanea tarda and erythropoietic protoporphyria. *Immunol Ser*. 1989; 46: 671-685.

79. Liu F, Pan X, Chen G, Jiang D, Cong X, Fei R & Wei L. Hematopoietic stem cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor partly contribute to liver graft regeneration after partial orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl.* 2006; 12: 1129-1137.
80. Lyoumi S, Abitbol M, Andrieu V, Henin D, Robert E, Schmitt C, Gouya L, de Verneuill H, Deybach JC, Montagutelli X, Beaumont C & Puy H. Increased plasma transferrin, altered body iron distribution, and microcytic hypochromic anemia in ferrochelatase-deficient mice. *Blood.* 2007; 109: 811-818.
81. Magness ST, Maeda N & Brenner DA. An exon 10 deletion in the mouse ferrochelatase gene has a dominant-negative effect and causes mild protoporphyria. *Blood.* 2002; 100: 1470-1477.
82. Magnus IA, Jarrett A, Prankerd TA & Rimington C. Erythropoietic protoporphyria. A new porphyria syndrome with solar urticaria due to protoporphyriaemia. *Lancet.* 1961; 2: 448-451.
83. Maines MD, Trakshel GM & Kutty RK. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem.* 1986; 261: 411-419.
84. Martini CN, Vaena de Avalos SG, Romero DG, San Martin de Viale L & Vila Mde C. Heme availability affects corticosterone and aldosterone biosynthesis in rat adrenal. *Steroids.* 1997; 62: 767-770.
85. Mathews-Roth MM, Pathak MA, Fitzpatrick TB, Harber LH y Kass EH. Beta carotene therapy for erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases. *Arch Dermatol.* 1977; 113: 1229-1232.
86. Mathews-Roth MM. Erythropoietic protoporphyria. *Br J Dermatol.* 1996; 134: 977.
87. McCullough AJ, Barron D, Mullen KD, Petrelli M, Park MC, Mukhtar H & Bickers DR. Fecal protoporphyrin excretion in erythropoietic protoporphyria: effect of cholestyramine and bile acid feeding. *Gastroenterology.* 1988; 94: 177-181.
88. Meerman L, Koopen NR, Bloks V, Van Goor H, Havinga R, Wolthers BG, Kramer W, Stengelin S, Muller M, Kuipers F & Jansen PL. Biliary fibrosis associated with altered bile composition in a mouse model of erythropoietic protoporphyria. *Gastroenterology.* 1999; 117: 696-705.

89. Menthena A, Deb N, Oertel M, Grozdanov PN, Sandhu J, Shah S, Guha C, Shafritz DA & Dabeva MD. Bone marrow progenitors are not the source of expanding oval cells in injured liver. *Stem Cells*. 2004; 22: 1049-1061.
90. Metselaar H. Long-term results of liver transplantation for protoporphyria. Porphyrins and Porphyrrias. www2.eur.nl/fgg/emco/porphyrias2007.
91. Morton KO, Schneider F, Weimer MK, Straka JG & Bloomer JR. Hepatic and bile porphyrins in patients with protoporphyria and liver failure. *Gastroenterology*. 1988; 94: 1488-1492.
92. Muraca M, Gerunda G, Neri D, Vilei MT, Granato A, Feltracco P, Meroni M, Giron G & Burlina AB. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet*. 2002; 359: 317-318.
93. Nakahashi Y, Taketani S, Okuda M, Inoue K & Tokunaga R. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human ferrochelatase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990; 173: 748-755.
94. Nakao K, Wada O, Takaku F, Sassa S, Yano Y & Urata G. The origin of the increased protoporphyrin in erythrocytes of mice with experimentally induced porphyria. *J Lab Clin Med*. 1967; 70: 923-932.
95. Navarro S, Del Hoyo P, Campos Y, Abitbol M, Moran-Jimenez MJ, Garcia-Bravo M, Ochoa P, Grau M, Montagutelli X, Frank J, Garesse R, Arenas J, de Salamanca RE & Fontanellas A. Increased mitochondrial respiratory chain enzyme activities correlate with minor extent of liver damage in mice suffering from erythropoietic protoporphyria. *Exp Dermatol*. 2005; 14: 26-33.
96. Nicholson DC, Cowger ML, Kalivas J, Thompson RP & Gray CH. Isotopic studies of the erythropoietic and hepatic components of congenital porphyria and 'erythropoietic' protoporphyria. *Clin Sci*. 1973; 44: 135-150.
97. Oh SH, Witek RP, Bae SH, Zheng D, Jung Y, Piscaglia AC & Petersen BE. Bone marrow-derived hepatic oval cells differentiate into hepatocytes in 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration. *Gastroenterology*. 2007; 132: 1077-1087.
98. Onaga Y, Ido A, Uto H, Hasuike S, Kusumoto K, Moriuchi A, Numata M, Nagata K, Hori T, Hayashi K & Tsubouchi H. Hypermethylation of the wild-type ferrochelatase allele is closely associated with severe liver complication in a family with erythropoietic protoporphyria. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 321: 851-858.

99. Pawliuk R, Bachelot T, Wise RJ, Mathews-Roth MM & Leboulch P. Long-term cure of the photosensitivity of murine erythropoietic protoporphyria by preselective gene therapy. *Nat Med.* 1999; 5: 768-773.
100. Pawliuk R, Tighe R, Wise RJ, Mathews-Roth MM & Leboulch P. Prevention of murine erythropoietic protoporphyria-associated skin photosensitivity and liver disease by dermal and hepatic ferrochelatase. *J Invest Dermatol.* 2005; 124: 256-262.
101. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O & Prockop DJ. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 4857-4861.
102. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS & Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science.* 1999; 284: 1168-1170.
103. Piomelli S. Free erythrocyte porphyrins in the detection of undue absorption of Pb and of Fe deficiency. *Clin Chem.* 1977; 23: 264-269.
104. Plosch T, Bloks VW, Baller JF, Havinga R, Verkade HJ, Jansen PL & Kuipers F. Mdr P-glycoproteins are not essential for biliary excretion of the hydrophobic heme precursor protoporphyrin in a griseofulvin-induced mouse model of erythropoietic protoporphyria. *Hepatology.* 2002; 35: 299-306.
105. Poh-Fitzpatrick MB, Whitlock RT & Leftkowitz JH. Changes in protoporphyrin distribution dynamics during liver failure and recovery in a patient with protoporphyria and Epstein-Barr viral hepatitis. *Am J Med.* 1986; 80: 943-950.
106. Poh-Fitzpatrick MB, Wang X, Anderson KE, Bloomer JR, Bolwell B & Lichtin AE. Erythropoietic protoporphyria: altered phenotype after bone marrow transplantation for myelogenous leukemia in a patient heteroallelic for ferrochelatase gene mutations. *J Am Acad Dermatol.* 2002; 46: 861-866.
107. Podvinec M, Handschin C, Looser R, Meyer UA. Identification of the xenosensors regulating human 5-aminolevulinate synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 9127-9132.
108. Polson RJ, Lim CK, Rolles K, Calne RY & Williams R. The effect of liver transplantation in a 13-year-old boy with erythropoietic protoporphyria. *Transplantation.* 1988; 46: 386-389.

109. Ponka P. Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood*. 1997; 89: 1-25.
110. Porra RJ & Jones OT. Studies on ferrochelatase. 2. An investigation of the role of ferrochelatase in the biosynthesis of various haem prosthetic groups. *Biochem J*. 1963; 87: 186-92.
111. Puy H, Robreau AM, Rosipal R, Nordmann Y & Deybach JC. Protoporphyrinogen oxidase: complete genomic sequence and polymorphisms in the human gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 226: 226-230.
112. Quesenberry PJ, Dooner G, Colvin G & Abedi M. Stem cell biology and the plasticity polemic. *Exp Hematol*. 2005; 33: 389-394.
113. Quintana-Bustamante O, Álvarez-Barrientos A, Kofman AV, Fabregat I, Bueren JA, Theise ND, Segovia JC. Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via *in vivo* cell fusion. *Hepatology*. 2006; 43: 108-116.
114. Rademakers LH, Cleton MI, Kooijman C, Baart de la Faille H & van Hattum J. Early involvement of hepatic parenchymal cells in erythrohepatic protoporphyria? An ultrastructural study of patients with and without overt liver disease and the effect of chenodeoxycholic acid treatment. *Hepatology*. 1990; 11: 449-457.
115. Rademakers LH, Koningsberger JC, Sorber CW, Baart de la Faille H, Van Hattum J & Marx JJ. Accumulation of iron in erythroblasts of patients with erythropoietic protoporphyria. *Eur J Clin Invest*. 1993; 23: 130-138.
116. Ramadori G & Armbrust T. Cytokines in the liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001; 13: 777-784.
117. Rand EB, Bunin N, Cochran W, Ruchelli E, Olthoff K & Bloomer JR. Sequential liver and bone marrow transplantation for treatment of erythropoietic protoporphyria. *Pediatrics*. 2006; 118: 1896-1899.
118. Rank JM, Carithers R & Bloomer J. Evidence for neurological dysfunction in end-stage protoporphyric liver disease. *Hepatology*. 1993; 18: 1404-1409.
119. Richard E, Méndez M, Mazurier F, Morel C, Costet P, Xia P, Fontanellas A, Geronimi F, Cario-Andre M, Taine L, Ged C, Malik P, de Verneuil H & Moreau-Gaudry F. Gene therapy of a mouse model of protoporphyria with a self-inactivating erythroid-specific lentiviral vector without preselection. *Mol Ther*. 2001; 4: 331-338.

120. Rickwood D, Wilson MT & Darley-Usmar VM. Isolation and characteristics of intact mitochondria. En: *Mitochondria: A Practical Approach*. Darley-Usmar VM, Rickwood D, Wilson MT. (eds). Oxford IRL Press. 1987: 1-16.
121. Rimington C & Cripps DJ. Biochemical and fluorescence-microscopy screening-tests for erythropoietic protoporphyria. *Lancet*. 1965; 17: 624-626.
122. Romeo G & Levin EY. Uroporphyrinogen 3 cosynthetase in human congenital erythropoietic porphyria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1969; 63: 856-863.
123. Roskams T, Cassiman D, De Vos R & Libbrecht L. Neuroregulation of the neuroendocrine compartment of the liver. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004; 280: 910-923.
124. Russo FP, Alison MR, Bigger BW, Amofah E, Florou A, Amin F, Bou-Gharios G, Jeffery R, Iredale JP & Forbes SJ. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2006; 130: 1807-1821.
125. Ruth GR, Schwartz S & Stephenson B. Bovine protoporphyria: the first nonhuman model of this hereditary photosensitizing disease. *Science*. 1977; 198: 199-201.
126. Sandberg S & Romslo I. Phototoxicity of protoporphyrin as related to its subcellular localization in mice livers after short-term feeding with griseofulvin. *Biochem J*. 1981; 198: 67-74.
127. Sarkany RP, Alexander GJ & Cox TM. Recessive inheritance of erythropoietic protoporphyria with liver failure. *Lancet*. 1994; 344: 958-959.
128. Schacter BA. Heme catabolism by heme oxygenase: physiology, regulation, and mechanism of action. *Semin Hematol*. 1988; 25: 349-369.
129. Schmidt H, Snitker G, Thomsen K & Lintrup J. Erythropoietic protoporphyria. A clinical study based on 29 cases in 14 families. *Arch Dermatol*. 1974; 110: 58-64.
130. Seo MJ, Suh SY, Bae YC & Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 328: 258-264.
131. Shi Z & Ferreira GC. Probing the active site loop motif of murine ferrochelatase by random mutagenesis. *J Biol Chem*. 2004; 279: 19977-19986.
132. Shipovskov S, Karlberg T, Fodje M, Hansson MD, Ferreira GC, Hansson M, Reimann CT & Al-Karadaghi S. Metallation of the transition-state inhibitor N-methyl

- mesoporphyrin by ferrochelatase: implications for the catalytic reaction mechanism. *J Mol Biol.* 2005; 352: 1081-1090.
133. Smith SG. The use of thin layer chromatography in the separation of free porphyrins and porphyrin methyl esters. *Br J Dermatol.* 1975; 93: 291-295.
134. Smith SJ & Cox TM. Translational control of erythroid delta-aminolevulinic synthase in immature human erythroid cells by heme. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1997; 43: 103-114.
135. Ta DT & Vickery LE. Cloning, sequencing, and overexpression of a [2Fe-2S] ferredoxin gene from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1992; 267: 11120-11125.
136. Taketani S & Tokunaga R. Rat liver ferrochelatase. Purification, properties, and stimulation by fatty acids. *J Biol Chem.* 1981; 256: 12748-12753.
137. Taketani S, Tanaka-Yoshioka A, Masaki R, Tashiro Y & Tokunaga R. Association of ferrochelatase with Complex I in bovine heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1986; 883: 277-283.
138. Taketani S, Inazawa J, Nakahashi Y, Abe T & Tokunaga R. Structure of the human ferrochelatase gene. Exon/intron gene organization and location of the gene to chromosome 18. *Eur J Biochem.* 1992; 205: 217-222.
139. Taketani S, Mohri T, Hioki K, Tokunaga R & Kohno H. Structure and transcriptional regulation of the mouse ferrochelatase gene. *Gene.* 1999; 227: 117-124.
140. Taléns-Visconti R, Bonora-Centelles A, Castell JV & Gómez-Lechón MJ. Fuentes alternativas de hepatocitos para la terapia celular. *Gastroenterol Hepatol.* 2006; 29: 366-376.
141. Tangkijvanich P, Thong-ngam D, Theamboonlers A, Hanvivatvong O, Kullavanijaya P & Poovorawan Y. Diagnostic role of serum interleukin 6 and CA 19-9 in patients with cholangiocarcinoma. *Hepatogastroenterology.* 2004; 51: 15-19.
142. Tenhunen R, Marver HS & Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem.* 1969; 244: 6388-6394.
143. Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM & Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology.* 2000; 31: 235-240.

144. Theocharis SE, Margeli AP y Kittas CN. Effect of granulocyte colony-stimulating-factor administration on tissue regeneration due to thioacetamide-induced liver injury in rats. *Dig Dis Sci*. 1999; 44: 1990-1996.
145. Tholpady SS, Katz AJ & Ogle RC. Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2003; 272: 398-402.
146. Thorgeirsson SS & Grisham JW. Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. *Hepatology*. 2006; 43: 2-8.
147. Tofilon PJ & Piper WN. Measurement and regulation of rat testicular delta-aminolevulinic acid synthetase activity. *Arch Biochem Biophys*. 1980; 201: 104-109.
148. Turnbull A, Baker H, Vernon-Roberts B & Magnus IA. Iron metabolism in porphyria cutanea tarda and in erythropoietic protoporphyria. *Q J Med*. 1973; 42: 341-355.
149. Tutois S, Montagutelli X, Da Silva V, Jouault H, Rouyer-Fessard P, Leroy-Viard K, Guenet JL, Nordmann Y, Beuzard Y & Deybach JC. Erythropoietic protoporphyria in the house mouse. A recessive inherited ferrochelatase deficiency with anemia, photosensitivity, and liver disease. *J Clin Invest*. 1991; 88: 1730-1736.
150. Vijayasarathy C, Damle S, Lenka N & Avadhani NG. Tissue variant effects of heme inhibitors on the mouse cytochrome c oxidase gene expression and catalytic activity of the enzyme complex. *Eur J Biochem*. 1999; 266: 191-200.
151. Wada O, Sassa S, Takaku F, Yano Y, Uratta G & Nakao K. Different responses of the hepatic and erythropoietic delta-aminolevulinic acid synthetase of mice. *Biochim Biophys Acta*. 1967; 148: 585-587.
152. Wahlin S, Aschan J, Björnstedt M, Broomè U & Harper P. Curative bone marrow transplantation in erythropoietic protoporphyria after reversal of severe cholestasis. *J Hepatol*. 2007; 46: 174-179.
153. Wang X, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M & Grompe M. The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 11881-11888.
154. Whatley SD, Mason NG, Khan M, Zamiri M, Badminton MN, Missaoui WN, Dailey TA, Dailey HA, Douglas WS, Wainwright NJ & Elder GH. Autosomal recessive erythropoietic protoporphyria in the United Kingdom: prevalence and relationship to liver disease. *J Med Genet*. 2004; 41: e105.

155. Whitcombe DM, Carter NP, Albertson DG, Smith SJ, Rhodes DA & Cox TM. Assignment of the human ferrochelatase gene (FECH) and a locus for protoporphyria to chromosome 18q22. *Genomics*. 1991; 11: 1152-1154.
156. Whitcombe DM, Albertson DG & Cox TM. Molecular analysis of functional and nonfunctional genes for human ferrochelatase: isolation and characterization of a FECH pseudogene and its sublocalization on chromosome 3. *Genomics*. 1994; 20:482-486.
157. Wu CK, Dailey HA, Rose JP, Burden A, Sellers VM & Wang BC. The 2.0 Å structure of human ferrochelatase, the terminal enzyme of heme biosynthesis. *Nat Struct Biol*. 2001; 8: 156-160.
158. Wu XZ & Chen D. Origin of hepatocellular carcinoma: role of stem cells. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 21: 1093-1098.
159. Zeviani M, Gellera C, Antozzi C, Rimoldi M, Morandi L, Villani F, Tiranti V & DiDonato S. Maternally inherited myopathy and cardiomyopathy: association with mutation in mitochondrial DNA tRNA(Leu)(UUR). *Lancet*. 1991; 338:143-147.



El conocimiento genera ignorancia