

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II**



**MECANISMOS DE REGENERACIÓN HEPÁTICA:  
REGULACIÓN POR ÓXIDO NÍTRICO Y  
PROSTAGLANDINAS**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR POR**

Miriam Zeini Moreno

Bajo la dirección de los Doctores:

Lisardo Boscá Gomar  
Sonsoles Hortelano Blanco

**Madrid, 2005**

**ISBN: 84-669-2751-4**

**MEMORIA DE TESIS DOCTORAL**



**MECANISMOS DE REGENERACIÓN HEPÁTICA:  
REGULACIÓN POR ÓXIDO NÍTRICO Y  
PROSTAGLANDINAS**

Presentada por

Miriam Zeini Moreno

para aspirar al grado de Doctor por la  
Universidad Complutense de Madrid

Dirigida por

Dr. Lisardo Boscá Gomar

Dra. Sonsoles Hortelano Blanco

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DPTO. DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II**



**MECANISMOS DE REGENERACIÓN HEPÁTICA:**  
**REGULACIÓN POR ÓXIDO NÍTRICO Y**  
**PROSTAGLANDINAS**

Miriam Zeini Moreno

Madrid, 2005

*Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Bioquímica (CSIC-UCM), Facultad de Farmacia U.C.M., bajo la dirección del Dr. Lisardo Boscá Gomar y la Dra. Sonsoles Hortelano Blanco, con ayuda de una beca de Formación de Personal Investigador de la Comunidad Autónoma de Madrid.*

“Una de las grandes fuentes de dicha en la vida  
es la satisfacción de la propia curiosidad”  
*Linus Pauling (1901-1994)*

*A mi familia*

*A Aaron*

## *Agradecimientos*

---



En la realización de esta Tesis son muchas las personas que me han enseñado y ayudado, y con las que he compartido este camino. A todos quiero agradecer que hayan hecho de este tiempo una experiencia tan enriquecedora.

Gracias al Dr. Lisardo Boscá, por su talante tranquilo y dialogante, por compartir su gran perspectiva científica, por guiar mis pasos y por escuchar mi opinión siempre.

Gracias a la Dra. Sonsoles Hortelano, mi *madrina* en la ciencia, gracias por saber tanto y enseñarme; gracias por tu paciencia, por tu cariño y por tus consejos en el trabajo y en los proyectos personales, por contar conmigo y por tener siempre tiempo para mí.

Mi más sincero agradecimiento a mi tutora, la Dra. Evangelina Palacios Alaiz, por su amable interés en mis progresos, por su ayuda y por recibirme siempre con tanta amabilidad. Y al Dr. Manuel Benito de las Heras, gracias por admitirme en el grupo de becarios del departamento y por su atención.

Gracias a la Dra. Paloma Martín, por tu apoyo y tu ayuda, por el gran interés mostrado por mi trabajo; gracias por compartir tu tiempo y las inquietudes del grupo con una sonrisa.

Gracias a todos los miembros del Instituto de Bioquímica y de CNIC, por facilitarme la labor diaria y poner todos los medios a mi alcance; y en especial a todos los becarios con los que he compartido la vida más precaria y también las ilusiones... gracias!

Quiero también agradecer a otros grupos de investigación que me han ayudado en la realización de este trabajo, con los que he participado en otros proyectos y con los que he compartido tan buenos momentos. Gracias

a la Dra. Fátima Bosch y Anna Pujol, por su trabajo con los Tg NOS-2. Gracias especialmente al Dr. Ramón Bartrons y Dr. Jordi Bermúdez, y a todo el grupo de Ciencias Fisiológicas por acogerme en Barcelona. Al Dr. Jose Carlos Perales, por enseñarme *hydrodynamics*, y orientarme en mis proyectos; también a Alicia, por tu participación y tu sonrisa, por ayudarnos a terminar la historia, y a María por tu ayuda tan generosa y tu simpatía. Y gracias también al Dr. Ignacio Rodríguez-Crespo por las construcciones NOS-2.

Gracias al Dr. Carlos Lopez-Otín, por recibirme en su laboratorio y enseñarme; por su aprecio y por su ayuda. A Alberto Pendás y a Alicia por el tiempo compartido en el proyecto *Mely*. Al Dr. Bernhard Brüne, por su recibimiento, por compartir conmigo su particular visión de la vida y largas discusiones sobre ciencia. A todo el grupo de *Zell Biologie*, en especial a Tobias y Melvin, por vuestra cariñosa acogida, por compartir el *sprint*; y a Sabine, Betty, Silke, Christian, Mireia, Jurgen y Gerhard y al grupo *12.30 p.m.* por el *reset* in Deutschland.

Gracias al Departamento de Farmacología de Medicina, en especial a Dra. Teresa Tejerina por mi primera etapa en investigación, y a la Dra. M<sup>a</sup> Isabel Colado y a su grupo por su confianza y por abrirme siempre las puertas. También a Maite y la escuela de análisis clínicos de Farmacia, por su ayuda con las determinaciones de transaminasas y más, sin poner límite, gracias por ayudarme con esos datos.

Y cómo no! en la nueva etapa gracias al Dr. Juan Miguel Redondo y a todo su grupo, *la familia 120*, por vuestra generosidad, vuestra alegría y por hacer del laboratorio un sitio feliz para trabajar, gracias por compartir con nosotros la ciencia y los conocimientos.

Al Dr. Alberto Álvarez, gracias por tu ayuda y por las interesantes discusiones sobre citometría y más, y también a Raquel, Pili y Elvira por ayudarme a solucionar los pequeños y grandes problemas técnicos con una sonrisa.

Gracias también al grupo del Dr. Fernando Escrivá, y especialmente a Luis Goya, por los RPA. A Ángel, de animalario, por tu constante ayuda y por facilitarme todo lo que ha estado en tu mano. Y a Pilar González por su amabilidad en todo momento.

Y gracias a muchos de vosotros, por haberos convertido en grandes amigos para mí! A Patricia y a Merche, gracias por los primeros pasos. A Mariu y a Verónica, por los ratos de laboratorio y mejores momentos fuera, por vuestra complicidad, por compartir las inquietudes y nuestras ilusiones... gracias por vuestra amistad!

A todas las personas de la familia LB, a Antonio, Nuria y Olga por recibirme en el laboratorio, por precederme en muchas cosas y compartir vuestra experiencia conmigo. A Nuria también por las mini-PH 70%!! A Nora, Jimena, Amalia, Raquel por tantos momentos compartidos y Mónica (ya una más!) por la poesía y tu entusiasmo, y gracias Rafa, por tu genial ayuda en el diseño gráfico y las figuritas<sup>©</sup>! Y a Susana por tu ayuda inestimable y tu cariño. A los que nos han visitado y se han unido al grupo compartiendo más que ciencia... a Leticia por las cenas en BCN, a Esther y a Maga por vuestra simpatía.

Y qué no os he dicho ya??? gracias Dani, por tu entusiasmo, por tener siempre *un momento* y por las charlas, y Gemma gracias por tu cariño, por escucharme, por compartir ilusiones entre bailes y por ayudarme tanto!

Y por supuesto, gracias a mis niñas!!! A Lucía, por compartir lo dulce y lo amargo del viaje, por los momentos de antaño y de futuro, por tu enorme cariño; ...y a Paqui, por ser compañera de ilusiones y estar siempre a mi lado, por los geniales monólogos del club y las risas... por comprenderme y compartir las inquietudes.

A mis niñas del grupo D: a Esther, Elena, Bea, Nines, Mila,.....por emprender el camino juntas, por los ratos compartidos y por seguir aquí... y a las chicas de Al-Andalus, a Elena, por ayudarme a contemplar la ciencia desde otra perspectiva y por la ilusión.

Y gracias a mi familia! Gracias a todos por alegraros de mis éxitos y por vuestro cariño... porque nunca dudasteis de que lo conseguiría. Gracias Mama y Abuelito, por ser colegas, por compartir conmigo *mi primer laboratorio* y alentarme en mi trabajo. Gracias Papa y Abuelita, por enseñarme el valor del esfuerzo y la satisfacción del trabajo bien hecho. Gracias por preocuparos siempre de mí. Y qué podría decirte, Nadia! gracias por compartir la vida conmigo, por ser guía y por quererme tanto. Y a Eduardo, por tu cariño y los lógicos quebraderos de cabeza... y a Verita... por hacerme sentir una inmensa felicidad!

Y gracias Aaron! ...por animarme con tu extraordinario optimismo, por compartir la ilusión..., porque me brindas la felicidad todos los días, por caminar junto a mí y descubrir conmigo lo mejor de la vida. Gracias por quererme tanto... porque no podría ser más feliz!

## *Abreviaturas*

---

<b>1400W</b>	N-(3-(Aminomethyl)benzyl) acetamidine dihydrochloride
<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>AP-1</b>	Activator protein-1
<b>C/EBP</b>	CAAT enhancer-binding protein
<b>CHAPS</b>	cholamidopropyldimethyl-ammino-1-propanesulfonate
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>DETA-NO</b>	[(Z)-1-[2-(2-Aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl) amino] diazen-1-ium- 1,2-diolate
<b>DFU</b>	(5,5-dimethyl-3(3-fluorophenyl)-4-(4-methylsulphonyl) phenyl-2(5H)-furanone)
<b>DISC</b>	Complejo inductor de muerte (Death-inducing signaling complex)
<b>dNTPs</b>	desoxinucleótidos
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor (factor de crecimiento epidérmico)
<b>FADD</b>	Dominio de muerte asociado a Fas (Fas-associated death domain protein)
<b>FLIP</b>	FLICE inhibitory protein
<b>FLICE</b>	FADD-like interleukin-1 $\beta$ converting enzyme-like protease (caspasa 8)
<b>HGF</b>	Hepatic growth factor (factor de crecimiento hepático)

<b>IAP</b>	Proteínas inhibidoras de apoptosis (Inhibitor of apoptosis proteins)
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IGFBP</b>	Insulin-like growth factor binding protein
<b>IL-6</b>	Interleuquina 6
<b>L-NIL</b>	L-N <sup>6</sup> -(1-Iminoethyl) lysine, Dihydrochloride
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear κB
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>NSAIDs</b>	Anti-inflamatorios no esteroideos (non-steroidal antiinflammatory drugs)
<b>PAI</b>	Inhibidor del activador de plasminógeno
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PGs</b>	Prostaglandinas
<b>PH</b>	Hepatectomía parcial
<b>Socs</b>	Supresor de la señalización por citoquinas (supresor of cytokine signaling)
<b>Stat-3</b>	Transductor de señales y activador de la transcripción 3 (Signal transducer and activator of transcription 3)
<b>TdT</b>	Deoxinucleotidil transferasa terminal

<b>TGF</b>	Transforming growth factor (factor de crecimiento transformante)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TUNEL</b>	TdT-mediated dUTP nick end labelling
<b>uPA</b>	Activador de plasminógeno tipo urokinasa



*Indice*

---

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. REGENERACIÓN HEPÁTICA.....	3
1.1 Señalización por citoquinas.....	10
1.2 Señalización por factores de crecimiento.....	14
1.3 Integración de la señalización .....	18
1.4 Finalización del proceso de regeneración .....	21
2. DAÑO HEPÁTICO Y APOPTOSIS .....	25
3. ÓXIDO NÍTRICO.....	31
3.1 Papel del óxido nítrico en daño hepático y regeneración .....	36
4. PROSTAGLANDINAS .....	43
4.1 Prostaglandinas en daño y regeneración hepática.....	51
<b>OBJETIVOS</b> .....	55
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	59
1. REACTIVOS .....	61
2. MÉTODOS .....	62
2.1. Caracterización de los ratones.....	62
2.2. Mantenimiento de los animales y operaciones de hepatectomía parcial.....	67
2.3. Preparación de plásmidos y transfecciones en células.....	68
2.4. Transfección hidrodinámica en ratón.....	71
2.5. Preparación de extractos nucleares y citosólicos .....	72
2.6. Determinación de proteínas.....	72

2.7. Análisis de proteínas por Western Blot.....	73
2.8. Ensayo de retardo en gel, EMSA .....	74
2.9. Preparación y análisis de cortes histológicos de hígado .....	75
2.10. Determinaciones en plasma e incorporación de BrdU .....	76
2.11. Ensayo de la actividad caspasa <i>in vitro</i> .....	77
2.12. Métodos estadísticos.....	78
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>79</b>
1. La inhibición simultánea de la síntesis de óxido nítrico y prostaglandinas impide la supervivencia tras la PH.....	81
2. Alto índice de apoptosis en hígado tras la PH en ausencia de NO y PGs .....	86
3. Cambios en los factores de transcripción en el hígado durante la regeneración .....	89
4. Aumento de la supervivencia por el uso de inhibidores de caspasas .....	92
5. Retraso en la progresión del ciclo celular en ausencia de NO y PGs .....	94
6. La síntesis hepática endógena de NO retrasa la recuperación tras la PH.....	98
7. La síntesis local de NO retrasa la proliferación de hepatocitos pero protege frente a la apoptosis.....	106
8. La expresión transitoria de NOS-2 en hígado retrasa la regeneración hepática tras la PH.....	112

<b>DISCUSIÓN</b> .....	119
<b>CONCLUSIONES</b> .....	135
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	139

## *Introducción*

---

## **1. REGENERACIÓN HEPÁTICA**

El hígado es el órgano principal en la homeostasis metabólica, ya que es responsable del metabolismo, síntesis, almacenamiento y redistribución de nutrientes, carbohidratos, grasas y vitaminas. Además, el hígado elimina los desechos y xenobióticos por conversión metabólica y excreción biliar.

En vertebrados adultos, la capacidad de regeneración está limitada a muy pocos tejidos, entre ellos el hígado. La inusual capacidad regenerativa del hígado es un mecanismo de adaptación de los organismos, ya que el hígado es el principal órgano detoxificante del cuerpo y está expuesto al daño que puedan ocasionar toxinas ingeridas en la dieta. El tipo celular principal en el hígado y que desempeña la mayoría de funciones descritas es el hepatocito, que constituye el 80% de las células hepáticas. El otro 20% está integrado por células no parenquimáticas, que incluyen a células de Kupffer, células endoteliales, células epiteliales biliares y células esteladas o de Ito.

Aunque los hepatocitos adultos normalmente no se dividen, mantienen una gran capacidad proliferativa en respuesta a daño por agresión química, patógenos, xenobióticos y estrés inflamatorio. La capacidad de replicación de los hepatocitos en respuesta a estos daños hace posible la regeneración de la masa hepática incluso a partir de un bajo número de células ( Sandgren et al., 1991; Overturf et al., 1997).

Las referencias a esta extraordinaria capacidad regenerativa del hígado se encuentran ya en la mitología Griega, reflejadas en el mito de

Prometeo. Tras robar el secreto del fuego a los dioses y entregárselo a los humanos, Prometeo fue condenado por Zeus a permanecer encadenado a una roca. Allí, Prometeo era torturado por un águila que se alimentaba de su hígado. La regeneración de este órgano durante la noche convertía el castigo en un tormento interminable.

El estudio detallado del proceso regenerativo ha sido abordado científicamente usando aproximaciones moleculares y genéticas. El mejor modelo experimental para su estudio es la hepatectomía parcial (PH) en roedores (Higgins y Anderson R.M., 1931).

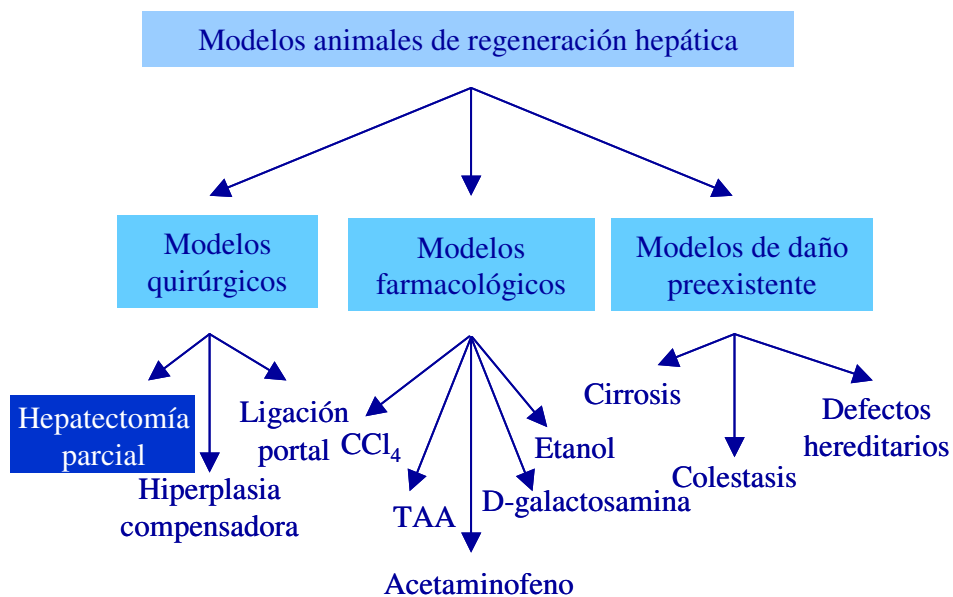
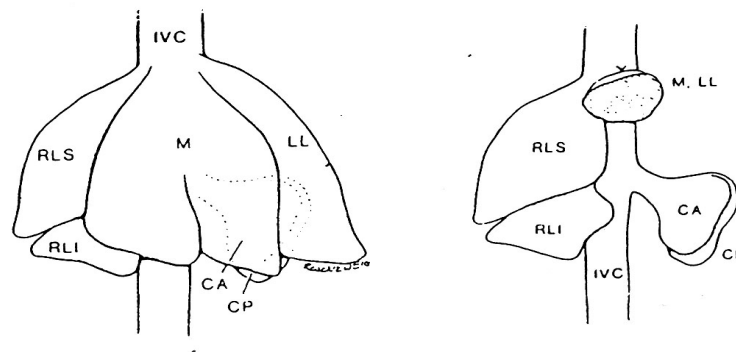


Figura 1. Modelos animales para el estudio de la regeneración hepática y respuesta del hígado frente a un daño. TAA= Tioacetamida; CCl<sub>4</sub> = tetracloruro de carbono.

A diferencia de lo que ocurre en otros modelos experimentales, como la utilización de tóxicos hepáticos, la PH no se asocia con daño tisular e inflamación y el inicio del estímulo está perfectamente definido en el tiempo (resección de los lóbulos hepáticos). En esta operación, dos terceras partes del hígado son eliminadas quirúrgicamente por ligadura de la circulación y posterior resección de los lóbulos hepáticos. Los lóbulos específicos son retirados intactos, sin causar daño a los lóbulos que se conservan. El hígado remanente inicia tras la PH una cascada de señalización que lleva a la regeneración del tejido. En este proceso regenerativo compensador, los lóbulos extirpados no vuelven a crecer sino que los lóbulos remanentes crecen hasta que su tamaño es adecuado a las demandas del organismo, generalmente en una semana tras la cirugía, deteniéndose entonces la proliferación.



---

Figura 2. Modelo de hepatectomía parcial descrito por (Higgins y Anderson R.M., 1931), según la cual se extirpa el 70% de la masa hepática, sin causar daño a los lóbulos remanentes.



En contraste con otros tejidos regenerativos (médula ósea, piel), la regeneración hepática no depende de un grupo de células progenitoras o células madre. Aunque algunos estudios sugieren que las células madre de médula ósea son capaces de diferenciarse a hepatocitos, no está claro si esto es un hecho poco habitual o que sólo tiene lugar en respuesta a determinados tipos de daño ( Petersen et al., 1999; Lagasse et al., 2000; Minguet et al., 2003). Estudios recientes también apuntan a que existen fusiones aisladas entre células madre de médula ósea y hepatocitos que pueden dar lugar a nuevas células de origen hepático (Vassilopoulos et al., 2003; Fausto and Campbell, 2003).

La regeneración tras la PH se lleva a cabo por la proliferación de todas las poblaciones celulares maduras presentes en el órgano, aunque los hepatocitos son los primeros en proliferar. Los hepatocitos son células normalmente quiescentes en fase  $G_0$  del ciclo celular y no se dividen (Michalopoulos y DeFrances, 1997; Fausto, 2000). Sin embargo, tras la PH se activan una serie de cascadas de señalización en el hígado y aproximadamente el 95% de los hepatocitos entran rápidamente en ciclo (Taub, 2004).

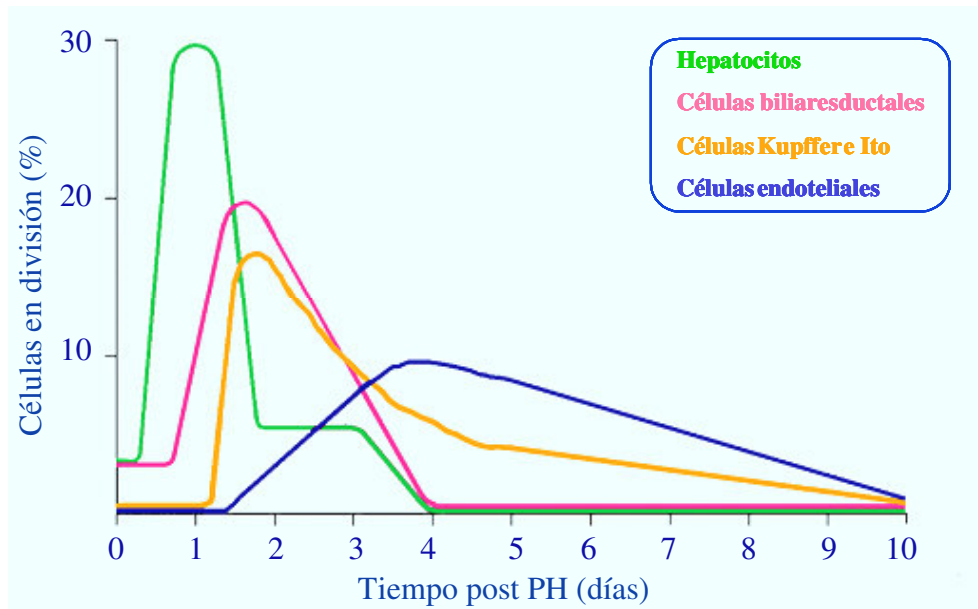


Figura 3. Cinética de síntesis de DNA en diferentes tipos celulares hepáticos durante la regeneración tras la PH en rata. Los diferentes tipos celulares presentes en el hígado sintetizan DNA a diferentes tiempos. El pico de proliferación para los hepatocitos es a las 24h y el resto de células proliferan más tarde. Los hepatocitos regenerantes producen factores de crecimiento que pueden funcionar como mitógenos para estas células. Esto ha sugerido la idea de que los hepatocitos pueden estimular la proliferación de otras células por un mecanismo paracrino.

Tras la resección de tejido hepático, las células de Kupffer aumentan la producción de IL-6 y TNF- $\alpha$ . Otros factores implicados en la regeneración son también liberados de páncreas (insulina), de duodeno o glándula salival (EGF), de glándula adrenal (noradrenalina), de tiroides (triyodotironina, T3) y de células esteladas (HGF). La cooperación entre todas estas señales permite a los hepatocitos progresar de fase G<sub>0</sub> hacia G<sub>1</sub> y a la fase S de síntesis de DNA.

Múltiples parámetros afectan a la duración del intervalo entre la PH y el inicio de la síntesis de DNA en hepatocitos (Krawitt et al., 1969; Yanagi y Potter, 1977). Incluso los ritmos circadianos pueden afectar a la síntesis de DNA y la expresión de las ciclinas tras la PH (Matsuo et al., 2003). La cinética de proliferación celular difiere ligeramente entre especies. Así, en el hígado de rata, la síntesis de DNA en hepatocitos comienza a las 12h tras la PH y tiene un pico aproximadamente a las 24h; mientras que en el ratón el pico de síntesis de DNA se produce a las 36-40h, con ligeras variaciones entre diferentes cepas.

El inicio de la síntesis de DNA en los hepatocitos tras la PH es un proceso sincronizado que comienza en el área periportal y después avanza hacia la zona perivenosa central (Rabes et al., 1976). La frecuencia de mitosis es menor de lo que cabría esperar dados los niveles de síntesis de DNA, y la ploidía de los hepatocitos y el porcentaje de células binucleadas aumenta con sucesivas replicaciones del DNA, lo que lleva finalmente a limitar el proceso regenerativo (Sigal et al., 1999). Durante los tres primeros días tras la PH se recupera la mayor parte de la masa hepática y la recuperación suele ser completa a los 5-7 días (Grisham, 1962).

El proceso de regeneración hepática se desarrolla en tres etapas: una fase de señalización temprana que pone en marcha la regeneración, una fase de proliferación celular (con mantenimiento de la función y estructura del hígado) y finalmente la parada de la respuesta proliferativa una vez que ha sido restituida una masa hepática adecuada. Los principales factores que inician el proceso de preparación para la regeneración son TNF- $\alpha$  e IL-6; la proliferación es estimulada por el factor de crecimiento hepático (HGF), el

factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y la terminación del proceso regenerativo está regulada por TGF- $\beta$  y activina, que detienen la proliferación celular.

### **1.1 Señalización por citoquinas**

Los factores de transcripción NF- $\kappa$ B, Stat-3, AP-1 y C/EBP- $\beta$  se activan rápidamente tras la PH (Cressman et al., 1995; FitzGerald et al., 1995; Greenbaum et al., 1998).

La activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y Stat-3 inmediatamente tras la PH condujo a la hipótesis de que las citoquinas podrían regular la respuesta regenerativa (Fausto, 2000). Las células de Kupffer son estimuladas tras la PH y liberan TNF- $\alpha$ . La señalización por TNF- $\alpha$  es requerida para la respuesta proliferativa, como se ha demostrado con el uso de animales carentes del receptor 1 de TNF- $\alpha$  (TNF-R1 KO), que presentan una deficiente activación de NF- $\kappa$ B y Stat-3 tras la PH (Yamada et al., 1997). Su importancia parece radicar en su capacidad para inducir IL-6, ya que el tratamiento con IL-6 restaura la capacidad síntesis de DNA en ratones TNF-R1 KO (Fujita et al., 2001). NF- $\kappa$ B aparece activo a los pocos minutos tras la PH (Cressman et al., 1994), debido a la acción de TNF- $\alpha$ . Los dímeros de NF- $\kappa$ B se traslocan al núcleo activando la transcripción de diversos genes (entre ellos, NOS-2 y COX-2). La ausencia de actividad NF- $\kappa$ B durante el desarrollo embrionario causa apoptosis en el hígado; TNF- $\alpha$  parece actuar como un agente apoptótico en el desarrollo hepático en ausencia de NF- $\kappa$ B.

La activación de NF- $\kappa$ B en las células de Kupffer tras la liberación de TNF- $\alpha$ , pone en marcha la transcripción y liberación de IL-6 (Aldeguer et al., 2002). La unión de IL-6 a su receptor (IL-6R, que está asociado a dos subunidades gp130), estimula la actividad tirosina quinasa de la JAK1

asociada (Levy y Lee, 2002; Heinrich et al., 2003). Esta JAK activada fosforila a gp130 y a Stat-3 en residuos de tirosina, produciéndose la dimerización de Stat-3. Los dímeros se traslocan al núcleo activando la transcripción. La estimulación de gp130 también activa la cascada de las MAPK. JAK activa Ras, que lleva a la activación de Raf-MEK-ERK. La señalización por MAPK es crucial en la proliferación celular y existen también evidencias recientes de que IL-6 puede activar directamente quinasas implicadas en supervivencia celular como PI3K y AKT (Levy y Lee, 2002).

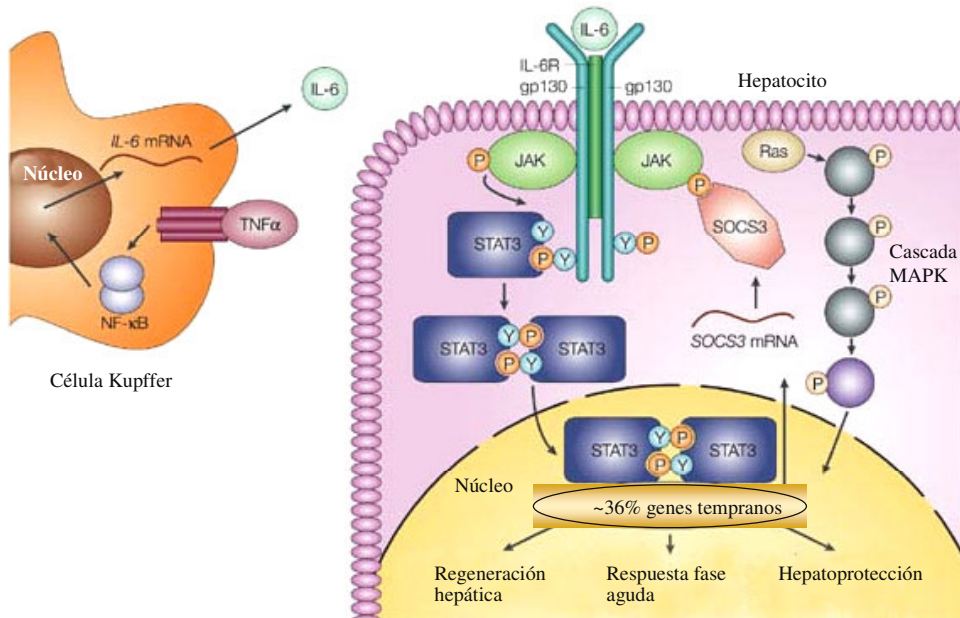


Figura 4. Señalización IL-6-Stat3.  $TNF-\alpha$  se une a su receptor en células de Kupffer aumentando la expresión de IL-6. La unión de IL-6 a su receptor activa JAK. Esto pone en marcha dos vías de señales: activación de la vía de las MAPK y fosforilación de Stat-3. Fosfo-Stat-3 dimeriza y se trasloca al núcleo donde media la activación de genes tempranos que participan en regeneración hepática, fase de respuesta aguda y hepatoprotección frente al daño mediado por Fas y tóxicos hepáticos. También se activa la transcripción de Socs-3, que interacciona con JAK bloqueando la señalización por citoquinas. Figura adaptada de (Taub, 2004).

Estudios con animales carentes de IL-6 han mostrado que esta citoquina es un efector principal durante la regeneración hepática y en hepatoprotección (Cressman et al., 1996; Sakamoto et al., 1999). Tras la PH en animales que carecen de IL-6, la recuperación de masa hepática está retrasada, caracterizándose por la existencia de necrosis y fallo hepático, con una deficiente activación de Stat-3 (Cressman et al., 1996; Li et al., 2001).

La carencia de Stat-3 resulta letal en estado embrionario y los animales carentes de Stat-3 selectivamente en hígado (Alb<sup>+</sup> Stat3<sup>-/-</sup>) presentan una recuperación retrasada tras la PH (Li et al., 2002). Sin embargo, no todas las anomalías que se observan en la regeneración en ratones Alb<sup>+</sup> Stat3<sup>-/-</sup> son idénticas a las que se describen para la falta de IL-6 (Li et al., 2002). La activación normal de las MAPK apoya la idea de que no todos los efectos de IL-6 en proliferación hepática están mediados por la activación de Stat-3 y más importante aún, que Stat-3 interviene en la progresión en el ciclo celular y proliferación en condiciones fisiológicas. El factor de células madre (SCF), un factor de crecimiento que se activa por proteólisis de pro-SCF y que se une al receptor tirosina quinasa Kit, es una diana recientemente identificada de IL-6 (Ren et al., 2003).

La respuesta inmune innata es un factor responsable, al menos en parte, de la producción de TNF- $\alpha$  e IL-6 por las células de Kupffer. El LPS interacciona con su receptor en la célula de Kupffer y pone en marcha el proceso de regeneración tras la PH y también en otros modelos de recuperación tras un daño (Cornell et al., 1990). En esta misma línea, otro estudio ha mostrado que miembros de la cascada del complemento, C3a y C5a, interaccionan con sus receptores en la célula de Kupffer para estimular la liberación de TNF- $\alpha$  e IL-6 (Fujita et al., 2001). Los defectos observados en la regeneración tras la PH en animales carentes de C3a y C5a se correlacionan con la reducción en los niveles TNF- $\alpha$  e IL-6 y la deficiente activación de NF- $\kappa$ B y Stat-3 (Mastellos et al., 2001; Strey et al., 2003).



## **1.2 Señalización por factores de crecimiento**

Además de la señalización por citoquinas tras la PH, diversos factores de crecimiento participan en la replicación celular durante la regeneración hepática. Los efectos de los factores de crecimiento están mediados a través de sus receptores. Dos sistemas de señalización ligando-receptor participan en la regeneración hepática, HGF y su receptor Met, y EGFR y sus ligandos y correceptores (Burr et al., 1998; Tomiya et al., 2000; Pediaditakis et al., 2001; Okano et al., 2003; Huh et al., 2004).

HGF es sintetizado por las células esteladas y actúa sobre los hepatocitos de manera paracrina. Tras ser sintetizado como pro-HGF es rápidamente activado por proteasas, uPA (activador de plasminógeno tipo uroquinasa) y su efector, plasminógeno, tras la PH o un daño hepático (Pediaditakis et al., 2001; Shimizu et al., 2001). En la rata, las concentraciones de HGF aumentan más de 20 veces en una hora tras la PH (Lindroos et al., 1991) y las concentraciones plasmáticas de HGF se elevan en humano cuando disminuye la masa hepática funcional (Tomiya et al., 1992).

HGF regula varios procesos en el hígado, además de ser un estimulador directo de la proliferación hepática. Dado que la delección del gen de HGF o de su receptor (Met) conlleva letalidad en estado embrionario (Schmidt et al., 1995; Burr et al., 1998; Pediaditakis et al., 2001; Okano et al., 2003; Huh et al., 2004), se han utilizado otros abordajes para el estudio de sus funciones *in vivo*. Estudios recientes en ratones deficientes del receptor Met en hígado, han mostrado que la señalización a través de HGF-

Met es importante para la síntesis de DNA y la regeneración tras PH (Borowiak et al., 2004) y tras un daño hepático (Huh et al., 2004).

Una excepción en este punto se refiere a los pacientes con fallo hepático agudo. En estos pacientes, los niveles de HGF en sangre son muy elevados pero existe una correlación inversa entre niveles de HGF y el pronóstico de la enfermedad (Tsubouchi et al., 1991). En esta situación, bien las células no responden a HGF o éste se acumula como precursor inactivo.

HGF es un potente mitógeno para los hepatocitos en cultivo (Michalopoulos et al., 1984; Gherardi y Stoker, 1990) y parte de sus efectos están mediados por la activación de otro factor de crecimiento, TGF- $\alpha$ , que actúa tras unirse a su receptor, EGFR. (Gherardi y Stoker, 1990). Los ligandos para EGFR incluyen a los factores de crecimiento EGF, TGF- $\alpha$ , anfíregulina, HB-EGF, epiregulina y betacelulina. Las concentraciones plasmáticas de EGF aumentan aproximadamente un 30% tras la PH. Aunque no se ha abordado todavía la regeneración hepática en un modelo de animales carentes de EGF, la baja producción de EGF debido a la falta de glándulas salivares ocasiona una recuperación retardada tras la PH (Jones, Jr. et al., 1995). EGF podría ejercer su función al hacerse más disponible para los hepatocitos tras la PH, ya que la disminución de la masa hepática a sólo un tercio tras la PH aumenta la concentración de EGF disponible por unidad de peso del órgano remanente. Además la noradrenalina, que también aumenta drásticamente tras la PH, estimula la secreción de EGF por las glándulas de Brunner (Olsen et al., 1985).

TGF- $\alpha$  es un potente mitógeno para hepatocitos en cultivo. Durante la regeneración hepática, los niveles de TGF- $\alpha$  se correlacionan mejor que

los niveles de HGF con la extensión del proceso proliferativo (Tomiyama et al., 1992; Tomiyama y Fujiwara, 1993; Tomiyama et al., 1997). En contraste con HGF, que estimula la replicación de forma paracrina y endocrina, TGF- $\alpha$  es un factor autocrino (Webber et al., 1993). En ratones carentes del gen de TGF- $\alpha$ , el desarrollo embrionario y la regeneración hepática transcurre con normalidad (Russell et al., 1996). Sin embargo, la administración de anticuerpos anti-TGF- $\alpha$  bloquean en parte la síntesis de DNA tras la PH (Tomiyama et al., 2000).

Aunque estos datos en principio se interpretaron como una consecuencia de la compensación con otros ligandos de EGFR, estudios recientes apuntan a que los ligandos de EGFR no son intercambiables indistintamente en sus funciones.

Los animales con delección homocigótica de HB-EGF, presentan una regeneración deficiente tras la PH (Mitchell et al., 2005). Los animales con delección homocigótica de anfiregulina, otro ligando de EGFR cuya expresión aumenta rápidamente tras la PH, presentaron un proceso de regeneración retrasado y disminuido (Berasain et al., 2005). Estos datos sugieren que existen funciones definidas para los diferentes ligandos de EGFR que no puede ser desempeñadas por otros ligandos del receptor en la regeneración hepática, así como en otros procesos biológicos (Michalopoulos y Khan, 2005).

La inyección de HGF en ratas normales, induce la síntesis de DNA en hepatocitos, pero el número de células que inician la síntesis de DNA está limitado a un área relativamente pequeña. Resultados similares aparecen con infusión de TGF- $\alpha$  y EGF. Esto sugiere que los hepatocitos en

el hígado normal no están preparados para responder a las señales mitogénicas sin una serie de señales iniciadoras que los lleve a un estado de respuesta (Webber et al., 1994).

### **1.3 Integración de la señalización**

TNF- $\alpha$  e IL-6 y factores de crecimiento como HGF son necesarios para la regeneración hepática, pero otras señales implicadas en la respuesta regenerativa no se han relacionado aún con la activación por citoquinas o factores de crecimiento. Por otro lado, la activación de JNK, factores de transcripción como (AP-1 o C/EBP- $\beta$ ) y otras señales como IGFBP-1, parece estar regulada por citoquinas y factores de crecimiento. La cooperación entre ambas vías de señales llevan a una recuperación total del hígado tras el daño.

Por ejemplo, TNF- $\alpha$  y HGF pueden activar JNK y MAPK-ERK, claves para la activación de Jun (Westwick et al., 1995), y también pueden inducir la expresión de ciclina D<sub>1</sub>, una proteína importante en el control del ciclo celular (Diehl et al., 1994; Talarmin et al., 1999). HGF y TNF- $\alpha$ -IL-6 desempeñan un papel importante en la activación de AP-1, implicado en la activación de proteínas que participan en proliferación (Behrens et al., 2002), y la cooperación de AP-1 con Stat-3 amplifica la expresión génica durante la regeneración (Peters et al., 2000).

Los altos niveles de C/EBP- $\alpha$  característicos en hígado disminuyen tras la PH, mientras que los niveles de C/EBP- $\beta$  aumentan. C/EBP- $\alpha$  estabiliza p21/WAF, inhibiendo la transición de G<sub>1</sub> a fase S (Hendricks-Taylor y Darlington, 1995). C/EBP- $\beta$  regula positivamente la expresión de genes que promueven progresión en el ciclo celular como ciclinas D<sub>2</sub> y A y retinoblastoma (Chen et al., 1996; Kramer et al., 1996). Entre las alteraciones en la regeneración tras PH en animales carentes de C/EBP- $\beta$  se

encuentra una expresión disminuida de genes tempranos y de ciclina E, aunque el nivel de ciclina D<sub>1</sub> es normal (Greenbaum et al., 1998).

IGFBP-1 es una de las señales más rápidas tras la PH y modula crecimiento celular por mecanismos dependientes e independientes de señalización por IGF. Aunque los ratones que carecen de IGFBP se desarrollan normalmente, tras la PH presentan niveles muy altos de necrosis hepática y una síntesis de DNA gravemente retrasada y disminuida (Leu et al., 2003a).

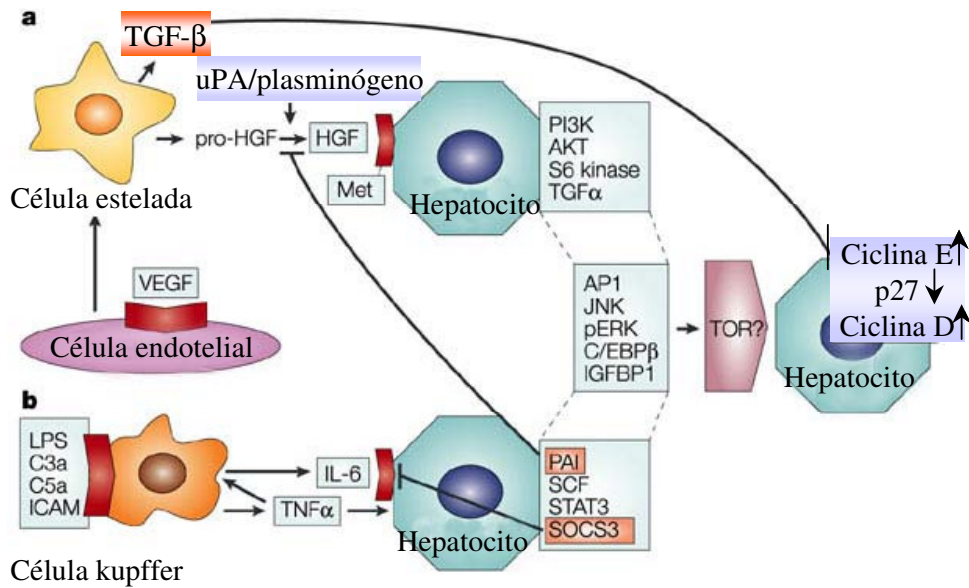


Figura 5. Señalización por citoquinas y factores de crecimiento en la regeneración hepática. Moléculas claves en inmunidad, como LPS, activan la producción de TNF- $\alpha$  e IL-6 por células de Kupffer. TNF- $\alpha$  e IL-6 activan Stat-3 (entre otras señales) y varias proteínas que también participan en la señalización por factores de crecimiento. Asimismo, se activan señales que participan en la finalización de la regeneración como TGF- $\beta$ , Socs-3 y p27. El factor de crecimiento HGF se une al receptor Met, activando la vía de PI3K y AKT y la liberación de TGF- $\alpha$  y otras señales compartidas con la señalización por citoquinas como AP1, JNK, ERKs, C/EBP- $\beta$  e IGFBP1. Esta señalización lleva al aumento de la expresión de ciclinas D1 y E y a una disminución de los niveles de p27. Adaptada de (Taub, 2004).

#### **1.4 Finalización del proceso de regeneración**

De la misma complejidad resulta la finalización de la regeneración, una vez alcanzada la masa hepática adecuada a las necesidades funcionales de organismo, con una precisión de  $\pm 10\%$  respecto a la masa original. Aunque la señalización implicada en esta fase no se conoce en detalle, se han identificado varios mediadores que participan en el proceso de finalización.

La mayoría de los estudios en este aspecto se han centrado en los miembros de la familia de TGF- $\beta$ , inhibidor de la proliferación de hepatocitos en cultivo (Carr et al., 1986; Derynck y Zhang, 2003). TGF- $\beta$  es considerado un apoptógeno que participa en el control del tamaño del hígado y que se encuentra elevado en determinadas infecciones virales hepáticas y cirrosis (Cain y Freathy, 2001). La síntesis de TGF- $\beta$ , y su diana Smad, aumentan tras la PH (Braun et al., 1988), pero los hepatocitos son resistentes a la acción de TGF- $\beta$  en los primeras etapas de la regeneración, posiblemente debido a la acción de la noradrenalina (Houck y Michalopoulos, 1989). La inducción de los inhibidores de TGF- $\beta$ /Smad, (SnoN y Ski) tras la PH puede contribuir a explicar la resistencia de los hepatocitos a TGF- $\beta$  durante la fase proliferativa al unirse a Smad. Durante la fase de proliferación se han detectado complejos de Ski y SnoN con Smads. Esto apunta a que los Smad activos participan en el establecimiento del estado quiescente de los hepatocitos una vez que se ha recuperado la masa hepática adecuada (Macias-Silva et al., 2002). Sin embargo, la regeneración continúa y se completa en ratones transgénicos que sobreexpresan TGF- $\beta$ 1 en hígado (Sanderson et al., 1995; Kopp et al.,



1996), apuntando a que TGF- $\beta$  no es la única señal finalizadora de la regeneración hepática. Aparte de sus efectos mitoinhibitorios, TGF- $\beta$  podría estimular los cambios tempranos en la movilidad de los hepatocitos y podría estar implicado en la regulación de la síntesis de nueva matriz a medida que la histología del hígado se reorganiza durante y tras la regeneración (Petersen et al., 1994; Stolz y Michalopoulos, 1997).

Experimentos realizados en animales que carecen del receptor de TGF- $\beta$  (TGFR-2 KO), muestran que TGF- $\beta$  regula el paso de G<sub>1</sub> a S pero la señal por TGF- $\beta$  no se requiere para el fin del proceso de regeneración. Estos animales presentan más activación de activina A y Smad. Un incremento de activina A podría compensar la regulación de la regeneración cuando la señalización por TGF- $\beta$  está inhibida o es suprimida (Oe et al., 2004).

La activina es un miembro apoptogénico de la familia de TGF- $\beta$  que bloquea la mitosis en los hepatocitos. La señalización por activina durante la etapa de regeneración es muy baja, ya que los niveles celulares de su receptor se encuentran reducidos. Pero tras la etapa proliferativa, los receptores de activina vuelven a sus niveles normales (Date et al., 2000). La señalización por TGF- $\beta$  y activina está controlada a otros niveles por factores extracelulares como la folistatina, así como por señalización intracelular. La administración de folistatina puede bloquear la señalización por activina y acelerar la regeneración hepática e incrementar el tamaño final del hígado (Takabe et al., 2003).

Además otros factores contribuyen al fin de la regeneración. Por ejemplo, la IL-6 produce un aumento de Socs3 en hígado, disminuyendo la

activación de Stat-3, para poner fin a la señal proliferativa mediada por IL-6 (Campbell et al., 2001). Este hecho podría también explicar los datos referentes a una menor recuperación tras PH en animales que sobreexpresan IL-6 (Wustefeld et al., 2000), ya que un aumento notable de Socs3 por IL-6 podría bloquear su propia señalización y la de otras citoquinas. Además, IL-6 puede frenar el efecto de HGF mediante la inducción de PAI (Shimizu et al., 2001).



## **2. DAÑO HEPÁTICO Y APOPTOSIS**

La muerte celular programada (PCD) o apoptosis es una forma común de muerte celular durante la embriogénesis, tumorigénesis y selección clonal del sistema inmune (Ellis et al., 1991; Schwartzman y Cidlowski, 1993). Sin embargo, un defecto o un exceso de apoptosis se encuentra implicado en diferentes situaciones fisiopatológicas como cáncer o enfermedades degenerativas (Krammer, 1999).

Existen dos vías alternativas para iniciar el proceso de apoptosis: una vía mediada por receptores de muerte situados en la superficie celular, denominada vía extrínseca, y otra mediada a través de la mitocondria o vía intrínseca (Krammer, 1999; Schmitz et al., 2000). Ambas vías confluyen en la activación de las caspasas (una familia de cisteín-aspartato proteasas) que producen la lisis de numerosos sustratos celulares conduciendo a la muerte por apoptosis.

Los receptores de muerte son miembros de la superfamilia de receptores de TNF, caracterizados por poseer un dominio intracelular, denominado dominio de muerte (Krammer, 1999; Schmitz et al., 2000). Los receptores de muerte son activados por sus ligandos naturales, la familia de TNF. Cuando estos ligandos se unen a sus respectivos receptores –como CD95/Fas, TRAIL-R1 o TRAIL-R2- los dominios de muerte atraen a proteínas adaptadoras como FADD. Estas proteínas adaptadoras reclutan hacia la membrana las proformas inactivas de determinadas caspasas, que son activadas en este complejo inductor de muerte (DISC) (Scaffidi et al., 1998). Las caspasas reclutadas en el complejo DISC, funcionan como

caspasas iniciadoras (caspasas 8 y 10) (Kischkel et al., 1995; Pitti et al., 1998).

La apoptosis mediada por un daño mitocondrial se inicia con la liberación de citocromo c y otros factores proapoptogénicos del espacio intermembranoso de la mitocondria (Martinou y Green, 2001; Zamzami y Kroemer, 2001). En el citosol, el citocromo c forma un complejo con Apaf1, ATP y la procaspasa 9. En este complejo, denominado apoptosoma, la caspasa 9 es activada.

Una vez que se han activado las caspasas iniciadoras, éstas son capaces de activar a las caspasas ejecutoras, principalmente caspasa 3. Las caspasas ejecutoras pueden procesar a otras procaspasas, amplificando de esta manera la cascada de activación proteolítica. Finalmente, las caspasas ejecutoras son capaces de procesar diferentes sustratos celulares conllevando los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis (Rathmell y Thompson, 1999).

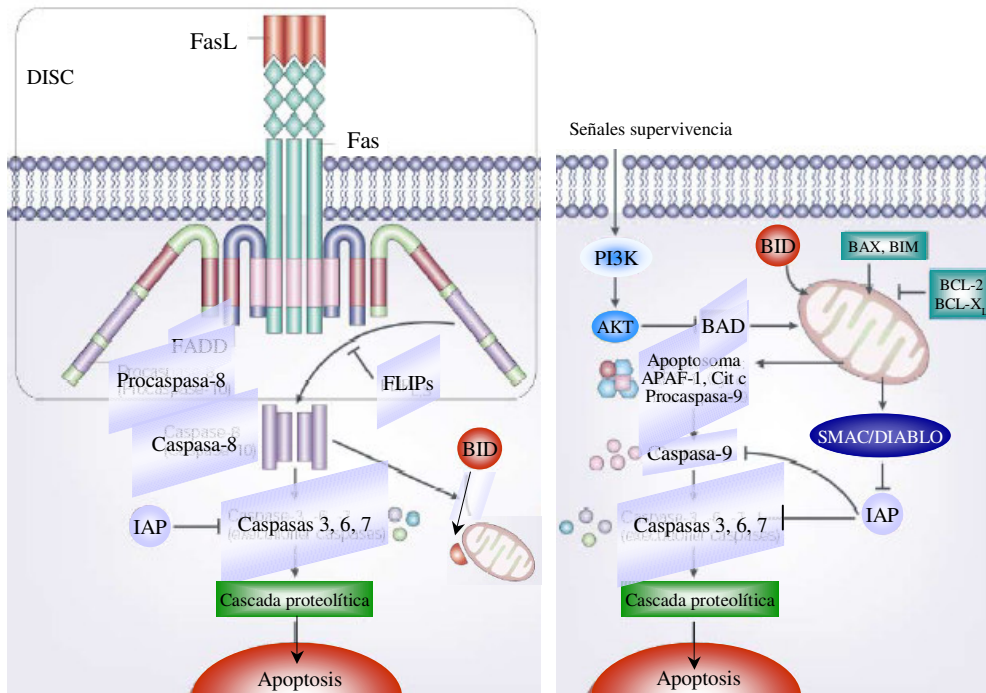


Figura 6. Señalización apoptótica. La apoptosis puede iniciarse por dos vías: una extrínseca, a través de receptores de muerte o por un daño a la mitocondria (vía intrínseca). La unión de un ligando a su receptor (CD95/Fas en la imagen) lleva a la formación del DISC que activa a la caspasa 8. Un daño a la mitocondria lleva a la liberación de citocromo c al citosol donde se une a Apaf-1 y procaspasa 9 formando el apoptosoma. Ambas vías convergen en la activación de caspasas ejecutoras llevando finalmente a la muerte celular por apoptosis. Figura adaptada de (Igney y Krammer, 2002).

La maquinaria apoptótica se encuentra finamente regulada a varios niveles. Los FLIPs interfieren con el inicio de la apoptosis directamente a nivel de los receptores de muerte, ya que poseen homología con la procaspasa 8 pero carecen de su sitio catalítico (Krueger et al., 2001). Su estructura les permite unirse al DISC, inhibiendo el procesamiento y activación de caspasa 8.

Los miembros de la familia Bcl-2, son un importante grupo de reguladores de la apoptosis a nivel mitocondrial (Martinou y Green, 2001; Zamzami y Kroemer, 2001). Se dividen en miembros proapoptóticos (BAX, BAK, BOK/MTD, Bcl-<sub>XS</sub>, BID, BAD, BIK/NBK, BLK, HRK/DP5, BIM/BOD, NIP3, NIX, NOXA, PUMA, BMF) y antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-<sub>X<sub>L</sub></sub>, Bcl-w MCL1, A1/BFL1, BOO/DIVA, NR-13) atendiendo a sus funciones. Las proteínas de la familia Bcl-2 regulan la permeabilidad de la membrana mitocondrial.

Los IAPs constituyen un tercer grupo de reguladores (Deveraux y Reed, 1999). Los IAPs se unen a las caspasas inhibiéndolas o bien actuando como ubiquitin-ligasas que promueven la degradación de las caspasas que unen. Se han identificado nueve IAPs en humanos (XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, ML-IAP, ILP2, livina, apolon y survivina). Los IAPs son regulados por la proteína SMAC/DIABLO, que se libera de la mitocondria junto a citocromo c durante la apoptosis y promueve la activación de caspasas uniéndose e inhibiendo a los IAPs (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000).

La apoptosis regulada por el receptor de muerte Fas, juega un papel fundamental en la patogénesis de enfermedades hepáticas como hepatitis viral y autoinmune, enfermedad alcohólica, enfermedad de Wilson, fallo

hepático agudo y cirrosis biliar primaria, sugiriendo que el control del sistema Fas-FasL puede ser de utilidad en el control de enfermedades hepáticas (Pinkoski et al., 2000). En daño hepático causado por determinados hepatotóxicos, se observa una apoptosis masiva de hepatocitos mediada por activación de la señalización por Fas o TNF- $\alpha$  (Ogasawara et al., 1993). La apoptosis mediada por Fas está restringida al hígado y es un modelo excelente para el estudio de la hepatitis fulminante. Los dos modelos experimentales más utilizados son la inyección de un anticuerpo anti-Fas o el tratamiento con concanavalina A (Tiegs et al., 1992; Ogasawara et al., 1993). La activación de caspasa 8 es la primera señal detectable de la activación de apoptosis por Fas (Kischkel et al., 1995; Medema et al., 1997).

Varias de las señales implicadas en el proceso de regeneración hepática también han mostrado su capacidad hepatoprotectora en modelos de daño hepático mediado por tóxicos o por anticuerpos anti-Fas. Así, IL-6 y Stat-3 han mostrado ser hepatoprotectores frente al daño mediado por Fas por su capacidad para aumentar los niveles de FLIP, Bcl-XL y Bcl-2 (Haga et al., 2003; Kovalovich et al., 2001). IGFBP-1 podría mediar protección frente al daño por Fas debido a su capacidad para prevenir el efecto de TGF- $\beta$  como apoptógeno (Cain y Freathy, 2001; Leu et al., 2003b). De la misma manera el NO puede proteger de la apoptosis mediada por Fas (Fiorucci et al., 2001; Fiorucci et al., 2002) o por otros modelos de daño hepático como el mediado por D-galactosamina y LPS (Mojena et al., 2001). Sin embargo, algunos autores han descrito por el contrario un daño mediado por NO en hígado ( Sass et al., 2001; Chang et al., 2003). También se han descrito efectos hepatoprotectores para las PGs en enfermedad

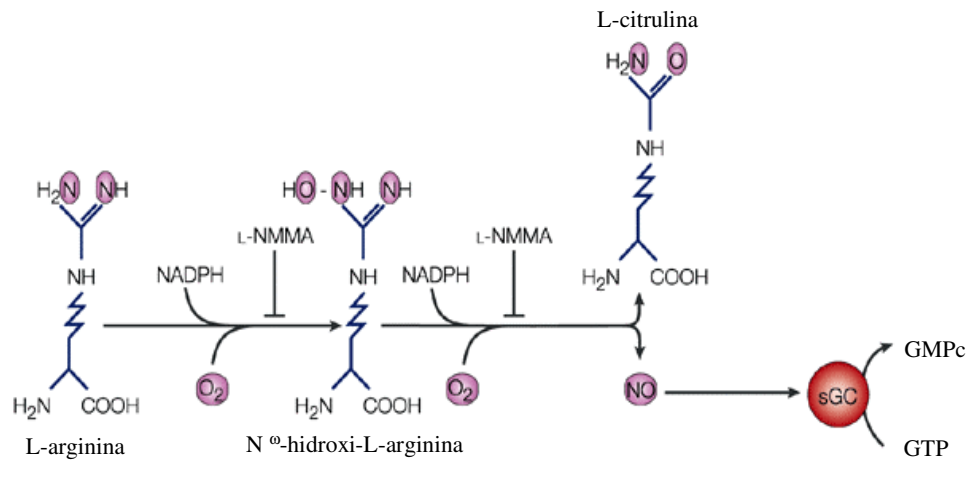


hepática experimental y en la clínica (Casado et al., 2001; Siendones et al., 2004; Beraza et al., 2005).

### **3. ÓXIDO NÍTRICO**

El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa de vida corta, que pasa fácilmente a través de las membranas celulares, pudiendo actuar sobre las células adyacentes. El NO es un importante mensajero intra e intercelular que desempeña variadas funciones en el organismo, desde la regulación del tono vascular hasta mensajero en SNC, participa en procesos de apoptosis... Esta variedad de acciones viene determinada por la concentración de NO producida y el proceso o sistema celular en el que participe. Además, el NO y sus generadores químicos pueden inhibir directa y reversiblemente la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS), enzima responsable de la síntesis de NO (Rengasamy y Johns, 1993).

El NO es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina por la enzima NOS (EC 1.14.13.39). La síntesis de NO a partir de L-arginina requiere oxígeno molecular y NADPH como cosustratos y FAD, FMN y BH<sub>4</sub> como cofactores. Todas las isoformas de NOS catalizan la oxidación de cinco electrones del nitrógeno del grupo guanidinio de la L-arginina, resultando en la formación de NO y L-citrulina vía un intermediario N-hidroxi-L-arginina.



*Figura 7. Biosíntesis del NO. La L-arginina es convertida en NO en dos pasos sucesivos. El primero consiste en la oxidación de dos electrones de la L-arginina, dando lugar a la formación de N<sup>ω</sup>-hidroxi-L-arginina, generando posteriormente L-citrulina y óxido nítrico. La síntesis de NO a partir de L-arginina requiere oxígeno molecular y NADPH como cosustratos y FAD, FMN, BH<sub>4</sub> como cofactores.*

El NO es el activador endógeno de la guanilato ciclasa soluble (GCs) en un amplio número de tejidos. La activación de este enzima y la producción de GMPc es el mecanismo de transducción de múltiples estímulos.

Las óxido nítrico sintasas fueron identificadas en 1989 y sus diferentes isoformas se clonaron y purificaron entre 1991 y 1994. Estas isoformas siguen la siguiente nomenclatura:

a) NOS-1 (tipo I, NOS-I, nNOS): fue la primera isoforma identificada y la predominante en tejido neuronal. Es una enzima de ~160 kD, citosólica y dependiente de Calcio/Calmodulina (Ca/CaM) (Knowles et

al., 1989; Bredt et al., 1990; Bredt y Snyder, 1990), que se expresa constitutivamente en cerebro (Bredt et al., 1990), glándula adrenal (Palacios et al., 1989), plaquetas (Radomski et al., 1990) y pulmón (Mayer y Bohme, 1989). Este enzima libera NO por cortos periodos de tiempo. Su diferencia de tamaño respecto a las otras dos isoformas de NOS radica en una región de 145 aa en el extremo N-terminal. En esta región se localiza el dominio PDZ que media interacciones proteína-proteína.

b) NOS-2 (tipo II, NOS-II, iNOS): isoforma inducible en un amplio número de tejidos y células. Es una isoenzima de ~130 kD, citosólica e independiente de Ca/CaM. Es inducida por endotoxinas como LPS o citoquinas como IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  o TNF-  $\alpha$  (Stuehr y Marletta, 1985; 1987a y 1987b). Inicialmente aislada en macrófagos murinos (Xie et al., 1992) esta enzima soluble y activa como dímero, es inducida en varios tipos celulares como hepatocitos (Curran et al., 1989), células de Kupffer (Billiar et al., 1990), células de músculo liso vascular (Busse y Mulsch, 1990) y células mesangiales (Pfeilschifter et al., 1992). Esta isoenzima produce mayores cantidades de NO y durante un periodo mayor de tiempo que las isoformas constitutivas.

c) NOS-3 (tipo III, NOS-III, eNOS): localizada por primera vez en células endoteliales vasculares, también se expresan constitutivamente en algunas neuronas y cardiomiocitos. El NO producido en el endotelio está implicado en vasodilatación, agregación plaquetaria, proliferación de células musculares lisas vasculares y otros mecanismos de homeostasis cardiovascular. Es una enzima dependiente de Ca/CaM y de ~140 kD. La

miristoilación y palmitoilación hace que NOS-3 se localice principalmente en la membrana plasmática.

Isoforma	nNOS	iNOS	eNOS
Expresión	Constitutiva	Inducible	Constitutiva
Localización	Soluble	Soluble	Particulada
Masa	~ 161 KDa	~ 131 KDa	~ 133 KDa
Estado nativo	Dímero	Dímero	Monómero
Cofactores	FMN, FAD, BH <sub>4</sub> , NADPH		
Localización	12q24.2	17cenq11.2	7q35-36

*Figura 8. Isoformas de NOS. Se han identificado tres diferentes isoformas distintas de NOS, producto de diferentes genes, con distinta regulación, propiedades catalíticas y sensibilidad a los inhibidores, y que presentan un 51-57% de homología entre las isoformas humanas.*

Entre todas las isoformas de NOS existe un alto grado de conservación, sugiriendo la existencia de un único precursor común. Las NOS poseen dos dominios estructurales: un dominio oxigenasa N-terminal y un dominio reductasa C-terminal que se encuentran ligados por el sitio de unión a Ca/CaM que actúa como bisagra. En el dominio oxigenasa se encuentra el centro catalítico hemo (grupo hierro-protoporfirina IX) y los sitios de unión para tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) y L-arginina. El extremo C-terminal presenta sitios de unión para FAD, FMN y NADPH (Richards y

Marletta, 1994; Ghosh et al., 1995; McMillan y Masters, 1995). La unión de calmodulina es indispensable para que la enzima sea activa, ya que alinea ambos dominios permitiendo la transferencia de electrones al centro catalítico. La activación de las NOS constitutivas precisa de un incremento en los niveles de calcio intracelular, lo que facilita la unión de la calmodulina. Sin embargo, NOS-2 se encuentra fuertemente unida a calmodulina, de modo que se activa sin necesidad de un aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Por este motivo, la NOS-2 una vez sintetizada se mantiene activa (Marletta, 1994) y produce grandes cantidades de NO, que constituyen un importante componente de la actividad antimicrobiana, antiparasitaria y antineoplásica de los macrófagos (Griffith y Stuehr, 1995).

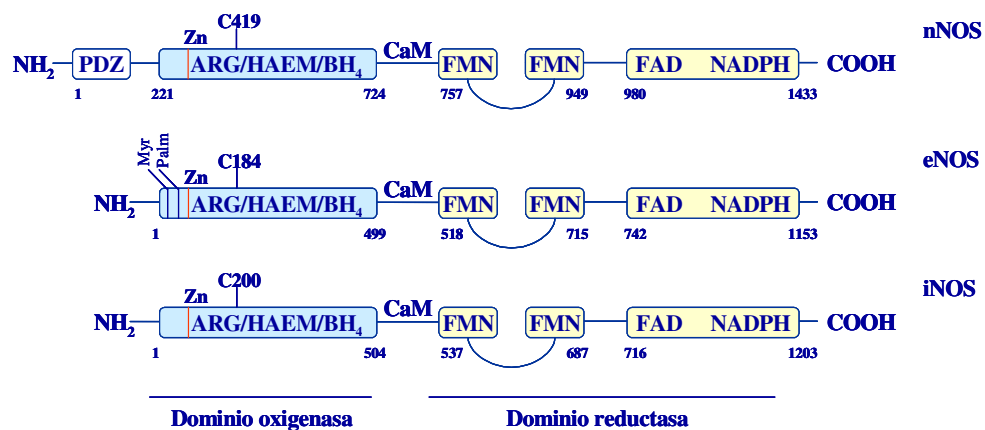


Figura 9. Dominios estructurales de nNOS, eNOS e iNOS humanas.

### **3.1 Papel del óxido nítrico en daño hepático y regeneración**

Varios grupos han determinado la inducción de NOS-2 en el hígado remanente tras la PH en ratón, pero esta respuesta es cuantitativamente mucho menor que en los animales que sufren un shock séptico, en cuanto a la cantidad de NO liberada. La expresión de NOS-2 se encuentra controlada por varios factores de transcripción, incluyendo NF- $\kappa$ B y AP-1. La expresión de NOS-2 en hígado es transitoria y la enzima es activa detectándose síntesis de NO *in vivo* usando la técnica de EPR (resonancia magnética de electrón) (Obolenskaya et al., 1994a y 1994b). Esta producción de NO, causada por la expresión de NOS-2, parece ser liberada y consumida exclusivamente en el hígado. Además, la actividad NOS y los niveles de mRNA se han detectado exclusivamente en hígado, indicando que esto es un efecto local (Hortelano et al., 1995). La contribución relativa de cada tipo celular a la actividad total de NOS y síntesis de NO parece ser diferente. Las células de Kupffer, aunque menos abundantes, producen mucho más NO que los hepatocitos cuando se cultivan en condiciones similares. Sin embargo, ya que el NO es un gas que difunde fácilmente entre células, el origen de esta molécula no resulta crítico para ejercer su función en células vecinas.

Tras la PH se observa una rápida liberación de TNF- $\alpha$  (Gallucci et al., 2000), que es seguida de la activación de NF- $\kappa$ B en el tejido remanente. La activación de NF- $\kappa$ B es un requerimiento esencial para la transcripción de NOS-2 (Diaz-Guerra et al., 1997). Los niveles de NOS-2 se controlan principalmente a nivel transcripcional (Diaz-Guerra et al., 1996) y dada la sincronía del proceso regenerativo tras la PH puede que la activación de

varios factores de transcripción participen en el aumento de la expresión de este gen. En el hígado remanente, la activación de NF- $\kappa$ B se inicia a los pocos minutos tras la PH. De acuerdo con estos datos, la activación rápida de NF $\kappa$ B sería suficiente para la transcripción de NOS-2. Aparentemente, sólo existe un pico de activación de NF $\kappa$ B y expresión de NOS-2, aunque la síntesis de NO se mantiene a tiempos superiores de 24h (Obolenskaya et al., 1994a y 1994b).



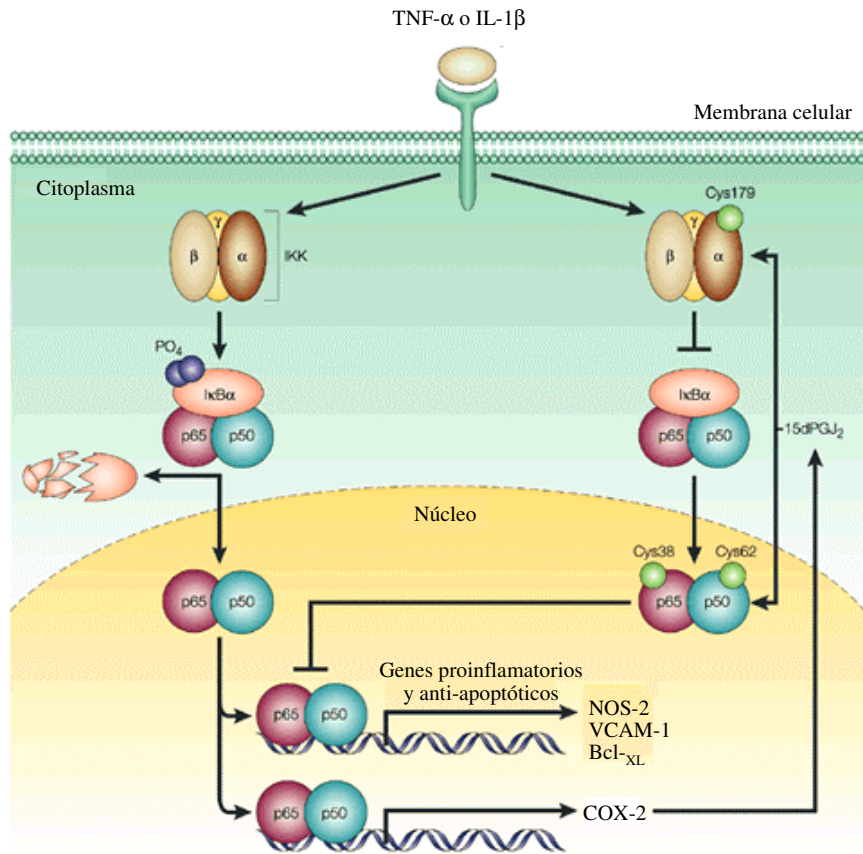


Figura 10. Vía de activación de NF-κB. Los complejos p50-p65 se traslocan del citosol al núcleo, tras la fosforilación y degradación de su inhibidor IκB-α. Su unión al DNA induce la expresión de diferentes genes, entre ellos NOS-2 y COX-2.

Respecto a la función del NO liberado tras la PH se han sugerido varias dianas, desde la modulación de la actividad de proteínas por S-

nitrosilación a efectos sistémicos en el flujo sanguíneo (Clemens, 1999; Debonera et al., 2001). Asimismo, el NO interviene en los cambios en la síntesis proteica hepática (Hortelano et al., 1995) y en el control de la respiración mitocondrial. Usando aproximaciones farmacológicas y genéticas se ha analizado el papel del NO en la regeneración: la inhibición de NOS-2 con inhibidores selectivos resulta en un aumento del radical superóxido en el hígado y en un alteración de ploidía en el tejido remanente 24h tras PH (Hortelano et al., 1995; Vos et al., 1997; Rosenfeld et al., 2000). Además, el NO es un importante regulador de la función de I $\kappa$ B- $\alpha$ , y así puede prevenir la activación de NF- $\kappa$ B una vez iniciada su síntesis (Díaz-Guerra et al., 1997). Animales con disrupción del gen NOS-2 muestran alteraciones en la respuesta regenerativa (Rai et al., 1998). La misma alteración se observa en animales que carecen de TNFR-1 (Yamada et al., 1998; Knight et al., 2000) o animales con una sobreexpresión de I $\kappa$ B- $\alpha$  (Rosenfeld et al., 2000). Sin embargo, animales con deficiencia en p50 muestran un proceso regenerativo normal (DeAngelis et al., 2001). También se ha propuesto un papel para el NO en la readaptación vascular tras la PH, previniendo el colapso de flujo sanguíneo tras la resección del tejido y favoreciendo la permeabilidad general a través del órgano, así como induciendo el inicio de respuestas metabólicas específicas que se requieren para iniciar el proceso de recuperación de función hepática (Hickey et al., 1997; Kumins et al., 1997; Hierholzer et al., 1998; Hollenberg et al., 1999; Hollenberg et al., 2000).

La PH en ratones con una disrupción del gen NOS-2 provoca un incremento de apoptosis en hepatocitos y una disminución de la recuperación del tejido (Rai et al., 1998). Esto sugiere que el NO (producido

por NOS-2), protege a las células de la muerte mediada por citoquinas inflamatorias. Existe una constante evidencia de que el NO puede prevenir el daño mediado por TNF- $\alpha$  sobre hepatocitos en animales tratados con LPS y en hepatocitos en cultivo (Bohlinger et al., 1995a y 1995b; Kim et al., 1997b). Así, es posible que la IL-6 proteja a los hepatocitos en el hígado regenerante de la acción de TNF- $\alpha$ , al menos en parte, debido a la inducción de la expresión de NOS-2.

El NO también participa en diferentes patologías hepáticas y en la regulación de los procesos apoptóticos en hígado. La apoptosis dependiente de NO se ha descrito en numerosos sistemas experimentales, así como bajo determinadas condiciones patológicas, tales como la esclerosis múltiple o la demencia asociada al SIDA (de Hemptinne et al., 1985; Thippeswamy y Morris, 1997; Albina y Reichner, 1998). El NO desempeña un doble papel en los procesos de apoptosis, dependiendo de la concentración local, la naturaleza de la célula diana y la presencia de otras moléculas reactivas, tales como el anión superóxido, que genera peroxinitrito. Así, la exposición a moderadas o altas concentraciones de NO o a agentes que inducen la expresión de NOS-2 provocan apoptosis en macrófagos, condriocitos, células  $\beta$  pancreáticas, fibroblastos, neuronas, células gliales o hepatocitos en distintos estados de diferenciación (fetal y adulto) (Nomura et al., 1996; Brune et al., 1997; De Groot et al., 1997). Sin embargo, otras células tales como las células endoteliales de la microvasculatura son extremadamente resistentes a la inducción de apoptosis por NO (Lopez-Collazo et al., 1997). El NO también ha mostrado ser un hepatoprotector en diferentes modelos experimentales (Bohlinger et al., 1995a y 1995b; Martin-Sanz et al., 1996; Kim et al., 1997a y 1997b). Bajas concentraciones de NO protegen frente a

la apoptosis inducida por estímulos apoptogénicos a través de la inhibición de determinadas caspasas (principalmente caspasa 3 y también caspasa 8) por procesos de S-nitrosilación (Kim et al., 2000). En hepatocitos el tratamiento con dosis moderadas de NO, puede inhibir la apoptosis inducida por la deprivación de suero, la apoptosis inducida por Fas o TNF- $\alpha$  de la misma manera que lo hacen los inhibidores de caspasas (Kim et al., 1997b). Además, donadores de NO fueron efectivos hepatoprotectores contra la apoptosis causada por el tratamiento *in vivo* con TNF- $\alpha$  en animales sensibilizados con D-galactosamina (Kim et al., 1997b). En estas situaciones, el mecanismo protector parece ser la inhibición de la caspasa 3 por S-nitrosilación. Asimismo, la expresión de un transgén inducible de NOS-2 también protegió a los animales de un daño hepático inflamatorio (Mojena et al., 2001).

Patología hepática	Papel del NO	Isoforma implicada
Apoptosis*	NO protege frente a la apoptosis*	iNOS
Regeneración	NO promueve la regeneración hepática	iNOS
Enfermedad alcohólica*	NO protege frente al daño hepático*	iNOS
SOS (enfermedad oclusiva)	Déficit de NO (vasoconstricción)	eNOS
Daño isquemia/reperfusión*	NO protege del daño hepático	eNOS
Cirrosis/Hipertensión portal*	Déficit de NO (vasoconstricción)	eNOS

*Figura 11. Efecto del NO en diferentes patologías hepáticas. \*En estas situaciones, la influencia del NO y la isoforma NOS responsable puede variar en función de las condiciones experimentales.*

#### **4. PROSTAGLANDINAS**

Las prostaglandinas (PGs) son ácidos grasos poliinsaturados biológicamente activos, derivados del ácido araquidónico, y que están presentes en la mayoría de tejidos. Entre las diversas acciones de las prostaglandinas destacan la regulación del tono vascular, la agregación plaquetaria, su participación en procesos de ovulación, remodelación ósea, procesos febriles, de dolor y otros mecanismos fisiológicos de defensa, incluyendo respuesta inflamatoria e inmune. La estructura de las PGs deriva químicamente del ácido prostanoico, que posee 20 átomos de carbono y un anillo pentagonal.

La biosíntesis de PGs está regulada por dos pasos metabólicos sucesivos: a) liberación del ácido araquidónico (AA), ácido graso insaturado que contiene cuatro dobles enlaces (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico) distribuido en la bicapa lipídica de la célula y normalmente esterificado con fosfolípidos y b) su conversión a prostanoides.

Las fosfolipasas son las enzimas que catalizan el primero de estos pasos. En concreto, las dos principales vías de liberación del AA son la fosfolipasa A<sub>2</sub> y la fosfolipasa C (Dennis et al., 1991). La fosfolipasa A<sub>2</sub>, tras ser activada por una serie de estímulos que generan un aumento del calcio intracelular, cataliza la desacilación del AA desde la segunda posición de ciertos fosfolípidos de membrana como, por ejemplo, la fosfatidilcolina. El AA también puede ser liberado a partir de una vía alternativa, en la que la fosfolipasa C cataliza la formación de diacilglicerol e inositol trisfosfato a partir del fosfatidilinositol; la diacilglicerol lipasa

cataliza posteriormente la liberación del AA a partir del diacilglicerol. Tras ser liberado de la membrana celular, el AA queda expuesto a la acción de las enzimas epoxigenasa P-450, lipooxigenasa y ciclooxigenasa. Estas vías constituyen las tres principales secuencias metabólicas relacionadas con el AA. Además, el AA puede convertirse en isoprostanos de manera no enzimática mediante peroxidación por radicales libres.

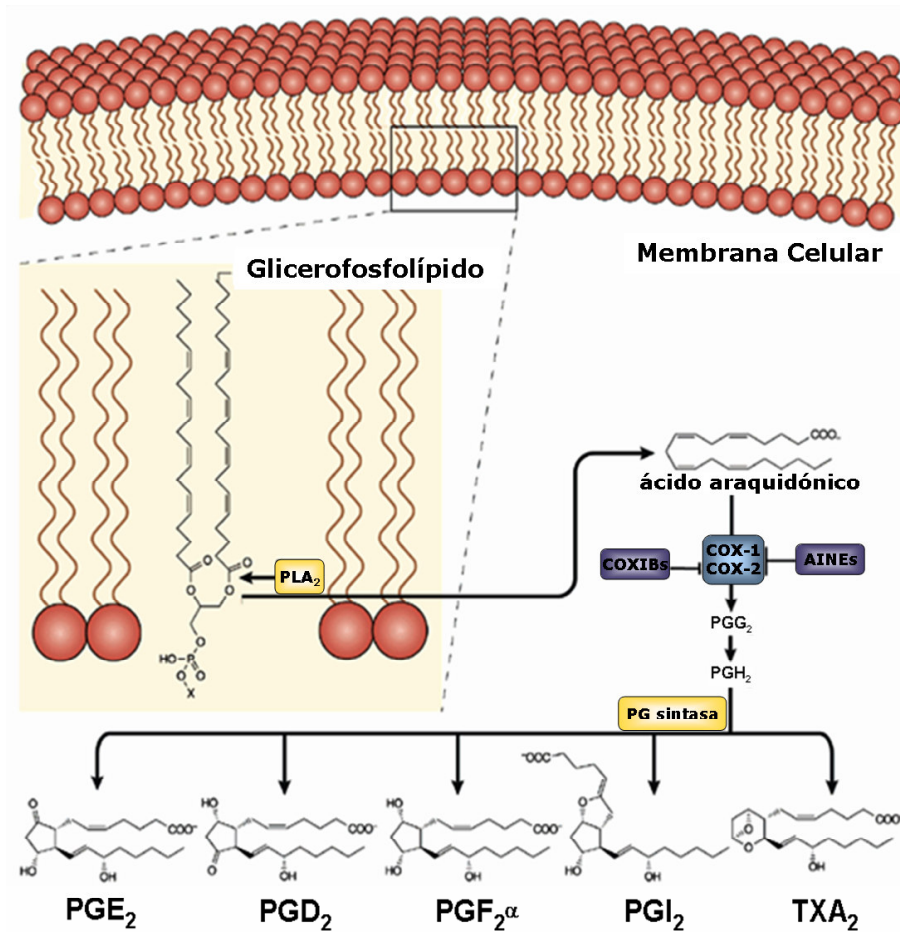


Figura 12. Reacción catalizada por la COX. La formación de PGH<sub>2</sub> transcurre en dos etapas, en la primera se forma el intermedio bicíclico PGG<sub>2</sub>. En la segunda etapa la peroxidación resulta en la reducción de PGG<sub>2</sub> a PGH<sub>2</sub>. A partir de PGH<sub>2</sub>, y debido a la actividad de enzimas específicos de tejido, se forman las distintas PGs y TX.



La prostaglandina H sintasa (PGHS; EC 1.14.99.1), también denominada ciclooxigenasa (COX), cataliza el paso limitante de la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos mediante la conversión del ácido araquidónico en prostaglandina H<sub>2</sub> (Williams y DuBois, 1996). COX es una enzima es bifuncional, con una actividad ácido graso ciclooxigenasa (catalizando la conversión de ácido araquidónico a PGG<sub>2</sub>) y una actividad prostaglandina hidroxiperoxidasa (catalizando la conversión de PGG<sub>2</sub> a PGH<sub>2</sub>). Finalmente, los productos biológicamente activos como PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> y PGD<sub>2</sub>, prostaciclina y tromboxanos son sintetizados por sintasas e isomerasas específicas de tejido.

Los prostanoides salen de la célula por transporte mediado por transportadores específicos y se unen a receptores de prostanoides acoplados a proteínas G (Negishi et al., 1995). Se han descrito 9 receptores de PGs y variantes por procesamiento alternativo, todos pertenecientes a la superfamilia de proteínas con siete segmentos transmembrana (Funk, 2001). Además, las PGs pueden controlar la transcripción génica a través de la activación de los receptores nucleares PPARs (Forman et al., 1996).

Existen dos isoformas de COX (Fu et al., 1990; Xie et al., 1991). Los genes para COX-1 y COX-2 se localizan en los cromosomas humanos 9 y 1, respectivamente (Funk et al., 1991; Tay et al., 1994). COX-1 y COX-2 son homodímeros que contienen cuatro hélices anfipáticas (Smith y DeWitt, 1996), pero carecen del característico dominio transmembrana. Mediante técnicas inmunocitoquímicas, COX-1 y COX-2 se han localizado en la membrana del retículo endoplásmico y en la nuclear, aunque COX-2, predomina en la envuelta nuclear (Morita et al., 1995). Las isoenzimas COX

comparten un 61% de identidad en su secuencia aminoacídica. La estructura de las proteínas COX consta de tres dominios distintos: un dominio N-terminal de homología con EGF, un dominio de unión a la membrana y un dominio C-terminal catalítico que contiene los sitios de actividad ciclooxigenasa y peroxidasa.

La isoforma constitutiva, COX-1, está presente prácticamente en todos los tejidos del organismo. Es la isoforma predominante en endotelio vascular, mucosa gástrica, plaquetas y tejido renal y media respuestas fisiológicas (citoprotección del estómago, agregación plaquetaria...) promoviendo la producción de PGs básicamente protectoras.

La isoforma inducible, COX-2, no se detecta en la mayoría de los tejidos en condiciones fisiológicas. Sin embargo, una gran variedad de factores proinflamatorios y citoquinas (LPS, IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TPA), factores de crecimiento (EGF, PDGF y FGF), hormonas (FSH y LH), especies reactivas de oxígeno y oncogenes (v-Src y v-Ras), entre otros, pueden inducir su expresión en diversos tipos celulares (DuBois et al., 1994; Su y Karin, 1996; Herschman, 1999; Smith et al., 2000).

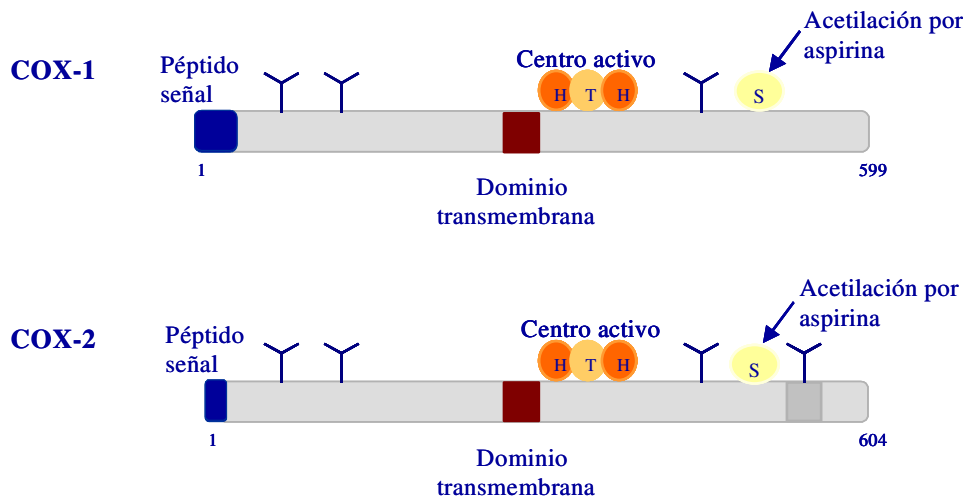


Figura 13. Representación de las isoformas COX-1 y COX-2 humanas. Las secuencias aminoacídicas de la COX-1 y COX-2 presentan un 60% de identidad. El péptido señal de COX-2 (17 aa) es más corto que el de COX-1 (24 aa). Próximo al extremo C-terminal, COX-2 posee un inserto de 18 aa que no está presente en COX-1 y que contiene un sitio adicional de N-glicosilación.

COX-2 es la isoforma responsable de la biosíntesis de prostanoïdes implicados en procesos patológicos, como procesos inflamatorios agudos y crónicos. Asimismo, los prostanoïdes generados por COX-2 pueden estimular a su vez la expresión de esta enzima, estableciéndose un proceso de retroalimentación positiva ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGI}_2$  y  $\text{PGE}_2$ ) (Su y Karin, 1996) o negativa (PGs ciclopentenonas). El producto mayoritario de COX-2,  $\text{PGE}_2$ , puede aumentar la expresión de COX-2 debido al aumento de cAMP en diversos tipos celulares como monocitos humanos de sangre periférica (Hinz et al., 2000) y queratinocitos murinos (Malve et al., 2000). Por el contrario, la prostaglandina ciclopentenona, 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina

J<sub>2</sub>, inhibe la inducción de COX-2 por LPS a través de la inhibición de IκB-quinasa y de la fosforilación de IκB (Castrillo et al., 2000; Straus et al., 2000; Willoughby et al., 2000).

Mientras que COX-1 es un gen constitutivo cuyo promotor carece de caja TATA (Kraemer et al., 1992), el promotor del gen de la COX-2 contiene caja TATA y sitios de unión para diversos factores de transcripción que incluyen a NFκB, NF-IL6 y CRE (Appleby et al., 1994). Sin embargo, parece que COX-1 podría ser inducible en varios tipos celulares como endotelio en respuesta a estrés, VEGF y trombina (Bryant et al., 1998; Okahara et al., 1998).

Los animales que carecen de COX-1 presentan una agregación plaquetaria disminuida, pero sin patologías gástricas (Langenbach et al., 1995). Los animales que carecen de COX-2 tienen defectos en la reproducción y en la función renal (Morham et al., 1995). Los ratones deficientes en ambas isoformas son inviables debido al fallo del cierre del ductus arteriosus tras el nacimiento (Loftin et al., 2002).

Aunque en principio se estableció la posibilidad de que COX-1 y COX-2 utilizaran diferentes reservas de AA porque usaban también diferentes PLs, estudios más recientes muestran que la producción de PGs por COX-2 puede implicar cualquiera de las PLAs identificadas. Así, la producción de PGs vía COX-2 no está controlada por un acoplamiento específico entre PLs y COXs (Murakami et al., 1999).

Existen tres grandes grupos de inhibidores de COX: aspirina, indometacina y otros NSAIDs (antiinflamatorios no esteroideos) e inhibidores selectivos de COX-2 o coxibs (FitzGerald y Patrono, 2001).

La diferencia en un único aminoácido en posición 523 (isoleucina en COX-1, valina en COX-2) han demostrado ser críticos en la selectividad de varios compuestos para COX-2. Así la valina, más pequeña, deja acceso al bolsillo lateral de COX-2 que ha sido propuesto como sitio de unión para los inhibidores selectivos de COX-2. En consecuencia, el sitio de unión total es aproximadamente un 17% mayor en COX-2 (Luong et al., 1996) y esto le permite unir inhibidores voluminosos más fácilmente que la isoforma COX-1 (Kurumbail et al., 1996).

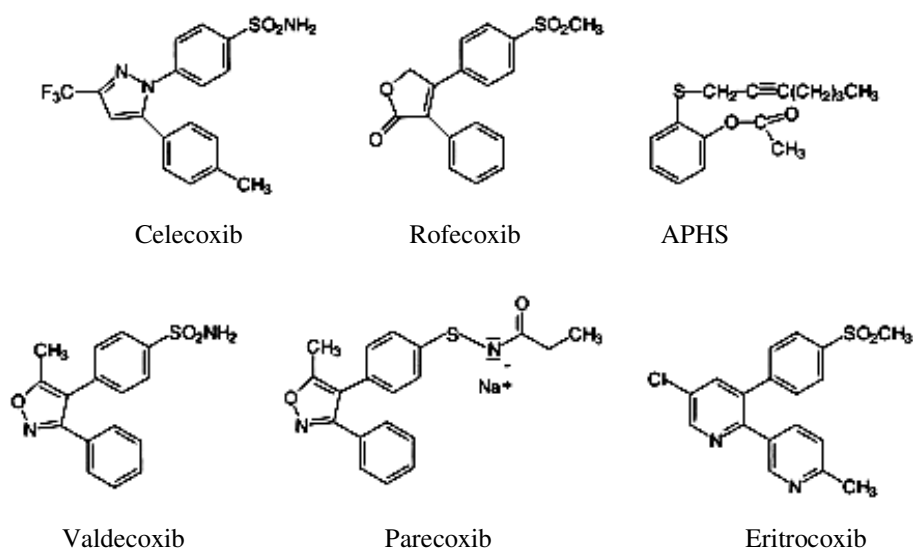


Figura 14. Estructura química de varios inhibidores selectivos de COX-2.

#### **4.1 Papel de las prostaglandinas en daño y regeneración hepática**

COX-1 y COX-2 se expresan constitutivamente en células esteladas (Gallois et al., 1998) y la inducción de COX-2 en células de Kupffer se produce por estímulos como la hiperosmolaridad (Zhang et al., 1995), alcohol (Nanji et al., 1997), citoquinas proinflamatorias y LPS ( Shimohashi et al., 2000; Kiemer et al., 2003), *in vivo* e *in vitro*.

Por el contrario, la contribución de los hepatocitos a la expresión de COX-2 es más controvertida. Los hepatocitos responden *in vivo* e *in vitro* a la mayoría de estímulos que regulan positivamente la expresión de COX-2 en otros tipos celulares incluyendo a LPS, TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$  (Herschman et al., 1995; Zhang et al., 1995). Sin embargo, los hepatocitos adultos no expresan COX-2 en condiciones de reposo, y sólo lo hacen en respuesta a intoxicación, infección viral o daño hepático agudo (Fernandez-Martinez et al., 2004), durante el proceso regenerativo post-PH (Casado et al., 2001) o en carcinoma hepatocelular (Gasparini et al., 2003); procesos todos ellos estrechamente relacionados con la remodelación de la matriz extracelular. Aunque los hepatocitos adultos no expresan COX-2 tras estímulos inflamatorios, la administración exógena de PGE<sub>2</sub>, estimula la proliferación de los hepatocitos a través del receptor EP1, que aumenta la secreción de TGF- $\alpha$ , que actúa como mitógeno en los hepatocitos (Kimura et al., 2001). Los hepatocitos fetales, que poseen un fenotipo diferente al de los adultos, sí son capaces de expresar COX-2 tras estímulos como LPS y citoquinas proinflamatorias (Martin-Sanz et al., 1998) y las PGs liberadas por COX-2 promueven la liberación de metaloproteasas de matriz 2 y 9, que están

implicadas en la señalización por diferentes vías: PKA, p38 MAPK, PI3K y activación de NF $\kappa$ B (Callejas et al., 2001).

Respecto al mecanismo por el cual el hígado adulto no expresa COX-2 tras diferentes estímulos, se ha mostrado que la sobreexpresión de C/EBP $\alpha$  en células AT3F y la expresión de altos niveles de C/EBP $\alpha$  en hígado adulto impiden la actividad del promotor de COX-2 (Callejas et al., 2000). Los hepatocitos fetales sí expresan COX-2 tras estímulos ya que poseen niveles más bajos de C/EBP $\alpha$ . Tras la PH se produce una disminución de los niveles de C/EBP $\alpha$ , los niveles plasmáticos de PGE<sub>2</sub> aumentan y COX-2 se encuentra inducida tras la operación. La expresión de COX-2 en el hígado regenerante va paralela a la disminución de los niveles de C/EBP- $\alpha$  y al aumento de C/EBP- $\beta$  y  $\delta$  (Casado et al., 2001).

La expresión de COX-2 influye en el patrón de moléculas que se expresan durante el inicio del ciclo celular. La administración de inhibidores de COX-2 en animales indujo un menor aumento de los niveles de PCNA, ciclinas D<sub>1</sub> y E tras la PH (Casado et al., 2001; Rudnick et al., 2001). Los ratones deficientes en COX-2 muestran un retardo en la proliferación celular tras la operación (Casado et al., 2001). El análisis de proteínas implicadas en las primeras etapas del proceso regenerativo muestra que la señalización mediada por las prostaglandinas producidas por COX-2 son importantes durante el proceso de regeneración hepática y que existe una interacción positiva entre las PGs sintetizadas por COX-2 y la progresión del ciclo celular.

La administración de PGE<sub>1</sub> parece mediar protección en disfunción hepática clínica y experimental (Siendones et al., 2004). La importante

inducción de COX-2 en la regeneración hepática tras la PH también parece estar relacionada con la inducción de dos hepatoprotectores, cardiotrofina 1 (CT-1) y VEGF, que se inducen tras la PH (Beraza et al., 2005).

Por tanto, la mayoría de estudios indican que la expresión de COX-2 en hígado se encuentra limitada a aquellas situaciones en las que se produce una desdiferenciación del tejido o un proceso de proliferación, sugiriendo un importante papel para las PGs en el inicio de las enfermedades hepáticas.

La relevancia de COX-2 en diversas patologías hepáticas también se ha puesto de manifiesto en infección por virus de la hepatitis B (Lara-Pezzi et al., 2002, Cheng et al., 2002) y C (Kondo et al., 1999), así como en carcinoma hepatocelular (HCC) (Rahman et al., 2001). Estudios recientes sugieren que la expresión de COX-2 puede ser un marcador pronóstico en HCC (Qin y Tang, 2002). El análisis del papel de COX-2 en HCC y el uso de los inhibidores selectivos de COX-2 ha sido revisado recientemente en (Hu, 2002; Koga, 2003).



## *Objetivos*

---

Los objetivos propuestos en el desarrollo de esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

- Determinar el papel del NO y de las PGs, sintetizadas por NOS-2 y COX-2 respectivamente, en la regeneración hepática en un modelo de PH y la posible señalización común mediada por NO y las PGs en este proceso regenerativo.
- Determinar el efecto sobre la regeneración hepática de la síntesis y liberación de NO en hígado previamente a la PH mediante diferentes abordajes experimentales:
  - Uso de animales transgénicos que sobreexpresan NOS-2 en hígado tras el ayuno.
  - Uso de la transfección hidrodinámica para expresar NOS-2 selectivamente en hígado.
- Determinar la relevancia del NO en la protección frente a la apoptosis en hígado.

## *Materiales y métodos*

---



## 1. REACTIVOS

Los reactivos de electroforesis fueron suministrados por Bio-Rad (Hercules, CA). Las membranas de PVDF empleadas en Western Blot fueron suministradas por Amersham. Los anticuerpos fueron de Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA), excepto los anticuerpos de  $\beta$ -actina y los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa que fueron de Sigma. El anticuerpo monoclonal Jo2 fue de BD (Pharmingen; San Diego, CA).

Los inhibidores selectivos de NOS-2, 1400W y L-NIL, fueron suministrados por Cayman. El donador de NO, DETA-NO, fue de Alexis. El inhibidor selectivo de COX-2, DFU, fue cedido por Merck.

Los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6 y PGE<sub>2</sub> en plasma se midieron usando reactivos comerciales de “Biotrak” de Amersham (Bucks, UK). Los reactivos para determinar la incorporación de BrdU y los reactivos para la determinación de TUNEL empleados en la detección apoptosis fueron suministrados por Roche.

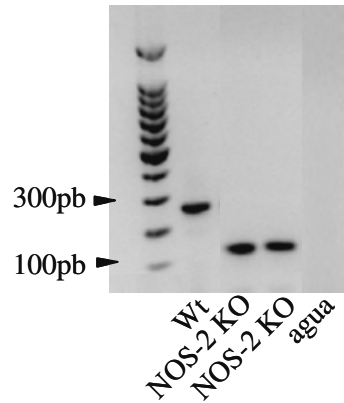
Los reactivos de PCR fueron de Invitrogen<sup>TM</sup> (Life technologies) y los oligos para el tipaje de los animales por PCR fueron de Isogen.

## 2. MÉTODOS

### 2.1. Caracterización de los ratones.

Los ratones NOS-2 KO (B6.129P2-*Nos2<sup>tm1Lau</sup>*) y la línea control (Wt; C57BL/6J000664) fueron suministrados por The Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME).

Los animales se tiparon por PCR utilizando DNA extraído de la cola, siguiendo las instrucciones específicas de Jackson Laboratories. Los oligonucleótidos utilizados para el tipaje por PCR de los ratones NOS-2 KO fueron los siguientes: IMR1216 (5'- ACA TGC AGA ATG AGT ACC GG-3'), que junto con el oligo IMR1217 (5'-TCA ACA TCT CCT GGT GGA AC-3') amplifica un fragmento de 108pb del alelo normal (Wt) y con el oligo IMR1218 (5'- AAT ATG CGA AGT GGA CCT CG-3') amplifica un fragmento de 270pb del alelo de los animales KO.



---

*Figura A. Tipaje de los ratones NOS-2 KO. Los animales fueron tipados por PCR de DNA de la cola, utilizando cebadores específicos recomendados por The Jackson Laboratories. Los fragmentos amplificados por PCR fueron resueltos en un gel de agarosa al 1.5%.*

Los ratones transgénicos PEPCK-NOS-2 expresan un gen quimera que contiene el fragmento *XbaI-BglII* del promotor de la PEPCK de rata (nucleótidos -450 to +73) ligados a la secuencia 5'-inicial del gen de la insulina humana donde el sitio de inicio de la transcripción fue deletado (fragmento *BglII-NcoI*). A esta secuencia, se unió la secuencia codificante completa del cDNA murino de NOS-2 (3.93 kb) y el extremo final 3' del gen de la insulina (fragmento *NcoI-HindIII*) y esta construcción fue clonada en un plásmido pTZ18R (USB), y posteriormente el fragmento de *KpnI-HindIII*, que contenía el gen fue microinyectada en óvulos fertilizados de ratones C57BL6/SJL (Mojena et al., 2001).

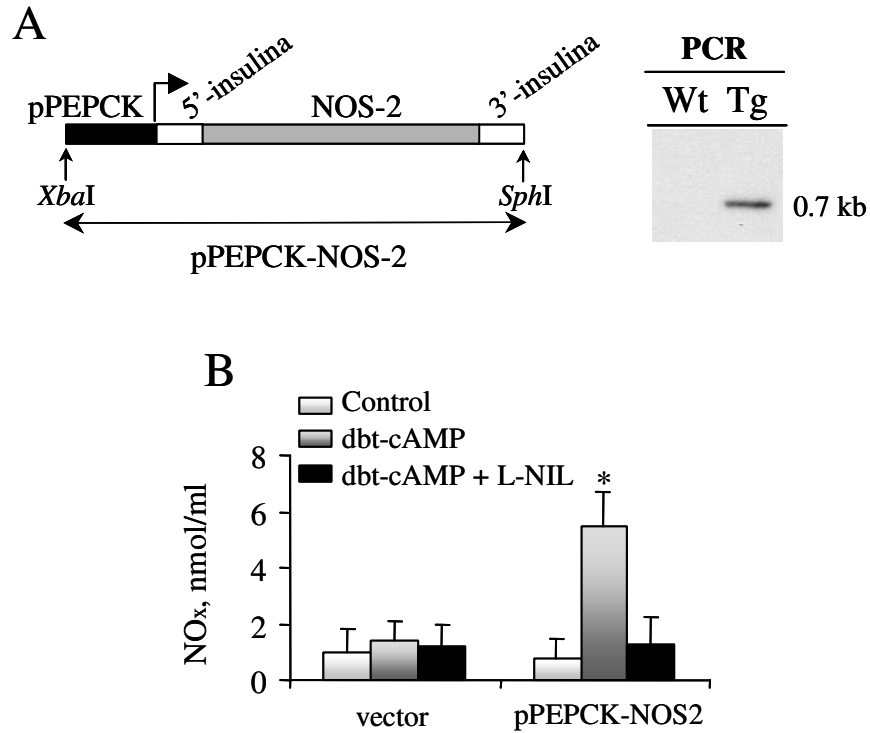
La presencia del transgén fue confirmada por PCR de la cola de ratón, usando cebadores específicos de la secuencia del transgén:

sentido: 5'-AACTGCAAGAGAACGGAGAA-3'

antisentido: 5'-GTCCTAGGTCACCAGGTTG-3'

Esta construcción clonada en el plásmido pTZ18R (USB) fue transfectada en células AT3F para comprobar la funcionalidad de la misma, su capacidad para expresar NOS-2 y producir NO.





*Figura B. Caracterización de los ratones transgénicos PEPCK-NOS-2 y funcionalidad de la construcción PEPCK-NOS-2. Los animales fueron tipados por PCR de DNA de la cola, utilizando cebadores específicos de la construcción del transgén (A). La capacidad del transgén para expresar una enzima NOS-2 funcional se determinó midiendo los niveles de nitratos y nitritos (NOx) en el medio de cultivo de células AT3F transfectadas con la construcción PEPCK-NOS-2, y estimuladas durante 24h con 50mM de dibutilil-AMP cíclico para favorecer la activación del promotor PEPCK. El resultado muestra la media de cuatro determinaciones. \*P<0.001 vs. la condición control (B).*

### **Extracción de DNA de cola de ratón**

Un trozo de la cola de ratón se incubó con 700 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 50mM, EDTA 100 mM, NaCl 100mM, SDS 1% y proteinasa K 0.4 mg/ml) a 55°C toda la noche. A la mañana siguiente se añadió RNAsa (0.125 mg/ml) y se incubó durante 2h a 37°C. Tras añadir 700 µl de fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1) y agitar durante 10min se centrifugó 15min a 13000rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se añadieron 700 µl de isopropanol para precipitar el DNA. El precipitado se recogió por centrifugación y se lavó con etanol 70%. Tras una nueva centrifugación el precipitado final se resuspendió en agua y se valoró en espectrofotómetro a 260nm/280nm. El DNA se mantuvo a -20°C.

### **PCR**

El tipado de los animales por PCR se realizó usando los cebadores específicos y reactivos de PCR de Invitrogen<sup>TM</sup> (Life technologies). La reacción se desarrolló en un termociclador eppendorf<sup>R</sup> en condiciones óptimas para cada caso. Los productos de amplificación se resolvieron posteriormente en un gel de agarosa al 1 o 1,5% y se visualizaron en un transiluminador UVA.

## **2.2. Mantenimiento de los animales y operaciones de hepatectomía parcial.**

Los animales se alimentaron *ad libitum* con una dieta estándar (Panlab, Barcelona) y se mantuvieron con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (con encendido de la luz a las 08:00 a.m). El ayuno de los animales transgénicos, para conseguir la expresión de NOS-2, y de sus controles se inició 18h antes del experimento.

Los animales fueron anestesiados con éter o con Ketamina / Xilacina (92/7 mg/Kg) intraperitoneal (i.p.) y sometidos a laparotomía con la eliminación del 70% del hígado. Las operaciones de hepatectomía parcial (PH), según el método descrito (Higgins y Anderson R.M., 1931) se realizaron entre las 08:00 y las 10:00 a.m, usando machos de 6-12 semanas de vida, con un peso comprendido entre 18-25 g (para los experimentos de transfección hidrodinámica *in vivo*, los animales no superaron los 20g de peso). Aquellos que mostraban letargia y falta de recuperación varias horas tras la anestesia y la operación fueron sacrificados y eliminados del experimento. Los animales fueron sacrificados con CO<sub>2</sub> a los tiempos indicados y los tejidos fueron inmediatamente congelados en N<sub>2</sub> líquido o en compuesto OCT™ (Tissue Tek) para su análisis posterior. La sangre se obtuvo de la vena de la cola.

El inhibidor de COX-2, DFU (1 mg/kg), los inhibidores de NOS-2 L-NIL (20 mg/kg) y 1400W (20 mg/kg), el inhibidor de caspasas, z-VAD (10 mg/kg), y el donador de NO, DETA-NO (15 mg/kg), se inyectaron (i.p.)

en solución salina 1h antes de la PH y a los tiempos indicados en los gráficos correspondientes en los resultados.

### **2.3. Preparación de plásmidos y transfecciones en células.**

#### **Transformación de bacterias competentes.**

Para la preparación de plásmidos se utilizaron bacterias Subcloning Efficiency<sup>TM</sup> DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> Chemically Competent *E.coli* (Invitrogen<sup>TM</sup> Life technologies). Las bacterias se descongelaron en hielo y se tomó una alícuota de 100 $\mu$ l en tubo de microcentrífuga para cada transformación. Directamente se añadieron 10ng de DNA plasmídico a las bacterias y se mezclaron con agitación suave sin pipetear. Tras incubación en hielo durante 30 min se sometieron a un choque térmico en un baño a 37°C durante 1min. Inmediatamente los tubos se pusieron de nuevo en hielo durante 5min y tras este tiempo se añadió 1ml de medio 2xYT (Triptona 16g/l, NaCl 5g/l y extracto de levadura 10g/l) sin antibiótico y se mezcló suavemente. Los tubos se incubaron en un baño a 37°C durante 1h. De cada tubo de transformación se tomaron 300 $\mu$ l y se sembraron en una placa de 2xYT-agar con antibiótico (ampicilina). Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C.

**Crecimiento de bacterias transformadas y purificación de plásmidos mediante centrifugación en gradiente de cloruro de cesio.**

A la mañana siguiente se seleccionó una colonia y se inoculó con ella un tubo de 5ml de 2xYT con antibiótico (100µg /ml ampicilina) y se dejó crecer en agitación en un incubador de bacterias a 37°C. Por la tarde, el contenido total de este preinóculo se transfirió a un matraz con 250ml de 2xYT-ampicilina y se incubó en agitación durante toda la noche a 37°C. Las bacterias se centrifugaron posteriormente durante 5min. a 5000rpm y el precipitado se resuspendió en 6ml de solución I (glucosa 50mM, Tris 25mM pH 8.0, EDTA 10mM) y se transfirió a tubos de polipropileno de 50ml. Posteriormente, se añadieron 12ml de solución II preparada de forma extemporánea (NaOH 0.2N, SDS 1%) y se agitó inmediatamente con fuerza para lograr la lisis total de las bacterias. A este lisado se añadieron 9ml de solución III (KOAc 5M, ácido acético glacial 11.5% v/v) y se mezcló suavemente hasta aparición de un precipitado de aspecto lechoso. Se centrifugaron los tubos 5 min a 3000 rpm y el sobrenadante (DNA plasmídico, proteínas y RNA) se transfirió a un nuevo tubo. Las proteínas se eliminaron añadiendo 10ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Tras agitación vigorosa, se centrifugaron las muestras de nuevo a 3000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se precipitaron los ácidos nucleicos con etanol 100% completando hasta 50ml. Tras dejarlo durante 20min a temperatura ambiente, se recogió el precipitado por centrifugación a 3000rpm durante 20min. Tras retirar completamente el etanol, el precipitado se resuspendió en 4ml de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0).

Los gradientes de cloruro de cesio se prepararon añadiendo 4.7g CsCl<sub>2</sub> y bromuro de etidio (0.75 mg/ml final) al precipitado anterior reconstituido en TE. Los gradientes se centrifugaron en tubos Optiseal de Beckman con el rotor de ultracentrífuga vTi80 a 65000 rpm durante 18h. La banda de DNA se extrajo de la columna con una jeringa y se transfirió a un tubo de 15ml. El bromuro de etidio se eliminó totalmente mediante sucesivos lavados con n-butanol saturado. El volumen final se completó hasta 3ml con TE y se precipitó el DNA con 300µl de NaOAc 3M y 8 ml de etanol absoluto. Tras dejarlo precipitar durante 20min a temperatura ambiente se centrifugó 20 min a 3000 rpm. El precipitado se lavó con etanol al 70% frío, y tras una nueva centrifugación se resuspendió en 500µl TE. La concentración del plásmido se midió en espectrofotómetro a 260nm/280nm.

### **Transfecciones en células**

Para la transfección de estos plásmidos en células AT3F se utilizó Lipofectamina 2000 (Invitrogen<sup>TM</sup> Life technologies), siguiendo las instrucciones del proveedor. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos y al día siguiente, se transfectaron con 1 µg de DNA/pocillo. En tubos eppendorf se prepararon por separado 50µl de medio sin antibióticos ni suero + 2µl de lipofectamina y 50µl de medio sin antibióticos ni suero + 1µg del plásmido. Se agitaron con fuerza en agitador y posteriormente se añadió la lipofectamina sobre el plásmido. Se agitó con fuerza, se centrifugó brevemente y se dejó reposar durante 15 min. para favorecer la formación de los complejos de DNA con los liposomas. Pasado este tiempo se añadieron 100µl de complejos de transfección a cada pocillo y se dejó toda

la noche. A la mañana siguiente, se comprobó la eficiencia de la transfección mediante la fluorescencia de la GFP (construcciones GFP y GFP-NOS-2) o se estimularon las células con d-bt-AMP cíclico y se evaluó en todos los casos la producción de nitritos por el método de Griess (Hortelano et al., 1999).

#### **2.4. Transfección hidrodinámica en ratón**

Los plásmidos codificantes para GFP y la proteína de fusión GFP-NOS2 (Navarro-Lerida et al., 2004) (3 µg DNA / g peso) se inyectaron en la vena de la cola en un volumen final de 1.7-2 ml de suero salino fisiológico estéril. De acuerdo con el procedimiento de la transfección hidrodinámica (Liu et al., 1999), el *transgén* se expresó principalmente en el hígado, existiendo un pico de expresión máxima a las 24h tras la inyección. Tras 24 h, los animales se sometieron a PH o se les inyectó el anticuerpo monoclonal Jo2 (0.15-0.30 µg/g peso) frente al receptor Fas.

Los animales fueron sacrificados con CO<sub>2</sub> y los tejidos fueron inmediatamente congelados en N<sub>2</sub> líquido o en compuesto OCT™ (Tissue Tek) para su análisis posterior. La sangre heparinizada se centrifugó y el plasma se congeló a -20°C.

### **2.5. Preparación de extractos nucleares y citosólicos**

Muestras de hígado remanente (50-100 mg) se homogeneizaron en tampón A frío (Hepes 10 mM pH 7.9, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM) al que se añadió extemporáneamente una combinación de inhibidores de proteasas de Sigma (AEBSF 104Mm, aprotinina 80µM, leupeptina 2mM, bestatina 4mM, pepstatina A 1.5 mM, E-64 1.4 mM) y 0.5% Nonidet P-40. Tras la incubación en hielo durante 15 min se agitó vigorosamente en agitador durante 10s. El homogeneizado se centrifugó durante 30s y el sobrenadante (extracto citosólico) se fraccionó y congeló a -80°C. El precipitado nuclear se resuspendió en 100 µl de tampón C frío (Hepes 20 mM pH 7.9, NaCl 0.4 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, glicerol 20%), al que se añadieron los inhibidores mencionados anteriormente. El tubo se agitó a 4°C durante 30min, se centrifugó y el sobrenadante (extracto nuclear) se congeló a -80°C. Para extractos totales se homogeneizó el tejido en tampón A con 0.5% CHAPS y 1% Nonidet P-40.

### **2.6. Determinación de proteínas.**

La determinación de proteínas se realizó según el método descrito por Bradford (Bradford, 1975), usando albúmina de suero bovino como patrón. Los cambios de absorbancia a 595 nm son directamente proporcionales a la concentración de proteína presente en la muestra.



## **2.7. Análisis de proteínas por Western Blot**

### **Electroforesis y transferencia**

Las proteínas se fraccionaron electroforéticamente en un gel SDS-poliacrilamida al 10% (acrilamida/bisacrilamida, 29:1), en condiciones desnaturalizantes según el método descrito por Laemmli (1970). Los extractos de proteínas se calentaron a 95°C durante 10 min. en el tampón de muestras Laemmli (Tris-HCl 60 mM pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 3% y azul de bromofenol 0.005%) y cantidades iguales de proteína de cada muestra se cargaron en los geles. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas Hybond<sup>TM</sup>-PVDF (Amersham).

### **Inmunodetección**

Con el fin de saturar los sitios de unión inespecífica, las membranas se mantuvieron durante 2h en una solución de leche desnatada en polvo al 5% en TBS (Tris 10 mM pH 7.5 y NaCl 0.1 M). Transcurrido este tiempo, las membranas se incubaron con los anticuerpos específicos, durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación, las membranas se lavaron con TTBS (TBS y Tween-20 0.1%) y se incubaron durante 1h a temperatura ambiente con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa ( $\alpha$ -POD). Las membranas se revelaron mediante ECL (Amersham). Las membranas se expusieron a películas autorradiográficas (Hyperfilm-MP, Amersham). La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó por densitometría.

### **2.8. Ensayo de retardo en gel, EMSA** (*electrophoretic mobility shift assay*)

Este ensayo permite analizar la existencia de proteínas nucleares que se unen a una determinada secuencia específica de DNA. Las proteínas unidas específicamente a un fragmento de DNA marcado retardan la movilidad del fragmento durante su electroforesis en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante.

El oligonucleótido correspondiente al motivo  $\kappa$ B proximal del promotor murino de NOS-2 (Xie et al., 1993; Geng et al., 1995) [5'-gatc CCAACTGGGGACTCTCCCTTTGGGAACA-3' (50 ng)], se hibridó con su secuencia complementaria por incubación en tampón M (de enzimas de restricción) durante 5 min a 90°C y posterior enfriamiento lento. 100 ng de estos oligonucleótidos hibridados se marcaron en los extremos 3' con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I en presencia de 50  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP y los restantes dNTPs no marcados en un volumen final de 50  $\mu$ l. Tras una incubación de 15 min a temperatura ambiente, la sonda marcada se purificó por precipitación en etanol y extracción de la sonda con fenol/cloroformo (1:1), eliminando los nucleótidos no incorporados. La actividad de la sonda se contó en un contador beta con líquido de centelleo.

### **Ensayo de unión al DNA**

La reacción de unión proteína-DNA se llevó a cabo incubando, durante 15 min. a 4°C, 5  $\mu$ g de proteína de extracto nuclear en presencia de  $5 \times 10^4$  cpm de la sonda de DNA y 1  $\mu$ g de poly (dI-dC) en tampón de

unión (10% glicerol, 0.2 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT y 40mM Hepes, pH 8) en un volumen final de 20 µl.

Los complejos proteína-DNA se separaron de la sonda libre mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 6% (acrilamida/bisacrilamida de 38:2), en tampón TBE 0.5x (Tris-borato 4.5 mM, EDTA 0.1 mM pH 8). El gel se fijó con una mezcla de ácido acético 10% y metanol 10% durante 15 min y se secó sobre papel Whatman 3MM en un secador de geles de Bio-Rad a vacío a 80°C durante 1h. El gel seco se expuso a una película Hyperfilm (Amersham) cuantificándose las señales por densitometría.

### **2.9. Preparación y análisis de cortes histológicos de hígado.**

Los tejidos fueron recogidos directamente y congelados en compuesto OCT<sup>TM</sup> (Tissue Tek). Los cortes seriados de 7 µm se hicieron con un criotomo (Leica CM1850) y varias secciones no consecutivas se recogieron en portaobjetos.

Para la detección y cuantificación de la apoptosis se usaron reactivos comerciales para TUNEL (Roche) siguiendo las instrucciones del distribuidor. Las preparaciones se fijaron con paraformaldehído 4% en PBS 1x pH 7.4, durante 10 min a temperatura ambiente, se lavaron con PBS 1x y se permeabilizaron con Tritón X-100 0.1% y citrato sódico 0.1% frío. La deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) incorpora nucleótidos marcados (FITC) a los extremos 3'-OH de las cadenas de DNA fragmentadas de las

células apoptóticas. El Hoechst 33342 (10 µg/ml) se utilizó para marcar (incubación durante 30 min a 37°C) y analizar los núcleos. Para la cuantificación se contaron 4 campos significativos de tres preparaciones procedentes de tres animales por condición y se reflejaron los porcentajes de células apoptóticas o células poliploides respecto al control.

Los tejidos de los animales transfectados mediante *inyección hidrodinámica* se analizaron para detectar la expresión de la proteína fluorescente GFP o de la proteína de fusión GFP-NOS2 en hígado.

La señal de fluorescencia se analizó con un microscopio confocal Radiance 2100 (Biorad). Las imágenes se registraron con el programa LaserSharp y se analizaron con LaserPix.

## **2.10. Determinaciones en plasma e incorporación de BrdU.**

La determinación de NO se realizó espectrofotométricamente midiendo la acumulación de nitratos y nitritos en el plasma de los animales o en el medio de cultivo en las células transfectadas mediante el método de Griess (Hortelano et al., 1999).

La creatinina y la alanina aminotransferasa (ALT/GPT) se analizaron en plasma espectrofotométricamente (Mojena et al., 2001).

Los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6 y PGE<sub>2</sub> en plasma se midieron por duplicado usando reactivos comerciales de “Biotrak” de Amersham (Bucks,

UK). La proliferación celular se evaluó mediante la incorporación de BrdU al DNA. Se administró a los animales 10 mg/kg de BrdU (i.p.) 3h antes de sacrificarlos. La incorporación de BrdU al DNA se determinó con reactivos para ELISA de Roche, siguiendo las instrucciones del proveedor.

### **2.11. Ensayo de la actividad caspasa *in vitro*.**

En este trabajo se ha utilizado la técnica de espectrofluorimetría para detectar la actividad caspasa *in vitro*. Esta técnica se basa en la capacidad de las caspasas presentes en un lisado celular de degradar proteolíticamente sustratos tetrapeptídicos. Esta proteólisis origina la liberación de una molécula fluorescente que se detecta por espectrofluorimetría.

Los extractos de tejido se prepararon en tampón A frío como se ha descrito para los extractos citosólicos. La actividad de la caspasa 3 se determinó en los extractos utilizando el sustrato fluorescente N-acetil-DEVD-AMC. Los sustratos utilizados para determinar la actividad de la caspasa 9 y la caspasa 8 fueron N-acetil-LEHD-AFC y N-Acetil-IETD-AFC respectivamente, siguiendo las instrucciones del proveedor (BD, Pharmingen).

### **2.12. Métodos estadísticos**

Los datos fueron analizados con SPSS software (Chicago). ANOVA se usó para evaluar la significación estadística de los experimentos indicados. El análisis de  $\chi^2$  fue usado para evaluar la significación estadística de la mortalidad y de la recuperación de masa hepática. Los resultados son la media  $\pm$  el error standard (SE), del número de experimentos que se indica en cada gráfico. La significación estadística fue estimada con la t Student para el resto de observaciones. El nivel de significación se define como  $P < 0.05$ .

## *Resultados*

---





*1. La inhibición simultánea de la síntesis de óxido nítrico y prostaglandinas impide la supervivencia tras la PH.*

Datos previos establecen que NOS-2 y COX-2 se expresan en hepatocitos remanentes tras la PH, y que el óxido nítrico (NO) y las prostaglandinas (PGs) sintetizados por estas isoenzimas, tienen un papel importante en la regeneración hepática (Obolenskaya et al., 1994b; Hortelano et al., 1995; Rai et al., 1998; Callejas et al., 2000; Callejas et al., 2001). La ausencia de una de estas actividades retrasa el proceso notablemente (Hortelano et al., 1995; Rai et al., 1998; Casado et al., 2001; Rudnick et al., 2001), mientras que la inhibición simultánea de NOS-2 (por delección génica) y COX-2 (por inhibición farmacológica con DFU) resulta letal tras la PH.

Para evaluar el papel del NO en la recuperación de la masa hepática tras la PH, se usaron animales carentes del gen de NOS-2. La falta de síntesis de NO tras la PH, conseguida mediante el tratamiento de los animales con el inhibidor selectivo de NOS-2, 1400W, o utilizando animales carentes del gen de NOS-2 (NOS-2 KO), no tuvo efectos sobre la supervivencia tras 70% PH. Esto indica que el NO desempeña una función no esencial en la regeneración hepática tras PH, aunque modula en cierta medida la cinética del proceso. Dado que datos previos mostraban una recuperación más lenta tras PH en animales carentes del gen COX-2 (Casado et al., 2001; Rudnick et al., 2001), se estudió el efecto de la inhibición de COX-2 en la regeneración hepática en el contexto de falta de NOS-2 (animales NOS-2 KO). Cuando se trataron ratones Wt con inhibidores de NOS-2 y COX-2, y ratones NOS-2 KO con un inhibidor

selectivo de COX-2 (DFU), respectivamente, los animales murieron entre los días 2 y 4 tras PH (figura 1A). Los pocos animales que sobrevivieron (40% en el grupo Wt tratado con DFU y 1400W, y menos del 20% en el grupo NOS-2 KO tratados con DFU) mostraban una recuperación de masa hepática notablemente disminuida determinada a los 5 días post-PH (figura 1B).

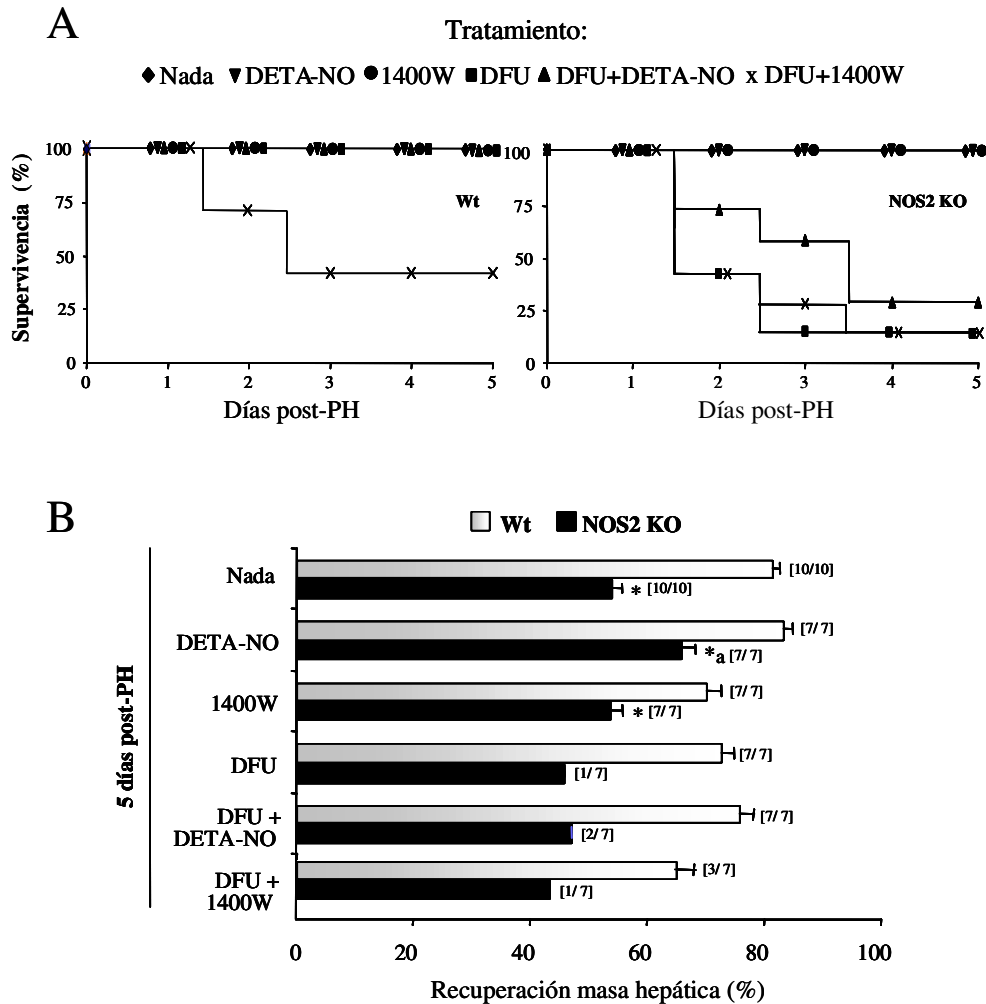


Figura 1. Letalidad en animales carentes de actividades NOS-2 y COX-2 tras la PH. Los animales Wt y NOS-2 KO fueron tratados con el donador de NO, DETA-NO (10 mg/Kg), el inhibidor de NOS-2, 1400W (20 mg/kg peso), el inhibidor selectivo de COX-2, DFU (1 mg/kg) o combinaciones de estos 1h antes de la PH y luego diariamente durante los 4 primeros días post-PH. A los 5 días se valoró la recuperación de masa hepática en los animales supervivientes. Los resultados muestran las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (A) y la media  $\pm$  SE del porcentaje de masa hepática recuperada a los 5 días de los animales que sobreviven ( $n=7-10$ , según indicado entre paréntesis). \* $P<0.05$  vs. su correspondiente Wt tras PH.  $aP<0.05$  vs. la recuperación de masa hepática de ratones NOS-2 KO tras PH.

La tasa de recuperación hepática tras la PH fue significativamente menor en los animales NOS-2 KO que en sus controles (figura 1B). Estos resultados indican que aunque la síntesis de NO no es esencial para la regeneración hepática, coopera con metabolitos dependientes de COX-2 en pasos esenciales para la supervivencia de los animales y para conseguir la recuperación del hígado remanente.

Así, la administración del donador de NO, DETA-NO (10mg/Kg), a ratones NOS-2 KO tratados con DFU retrasó la muerte de los animales y aumentó la supervivencia moderadamente (figura 1A). El análisis de la masa hepática a los 10 días tras la PH mostró una recuperación similar en Wt no tratados y en NOS-2 KO (figura 1B), confirmando la diferente cinética en la recuperación en las condiciones estudiadas pero no en el tamaño final del órgano recuperado.

La ausencia de NO o la inhibición simultánea de NOS-2 y COX-2 produjo un notable incremento en el daño hepático tras la PH como se refleja en los niveles séricos de transaminasas de los diferentes grupos de animales(figura 2).

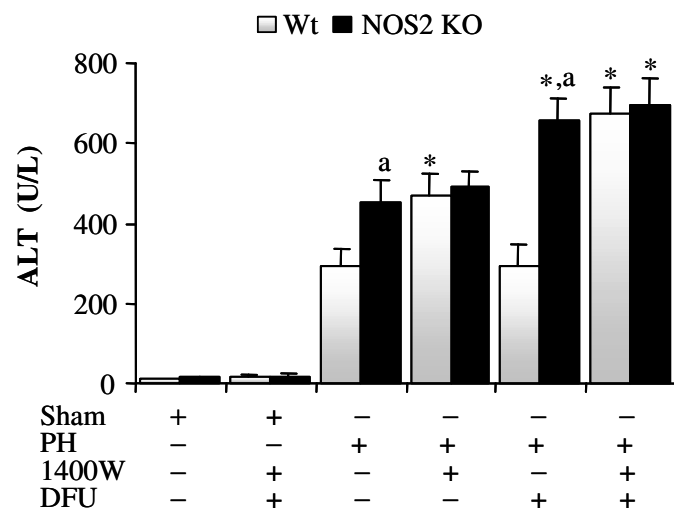
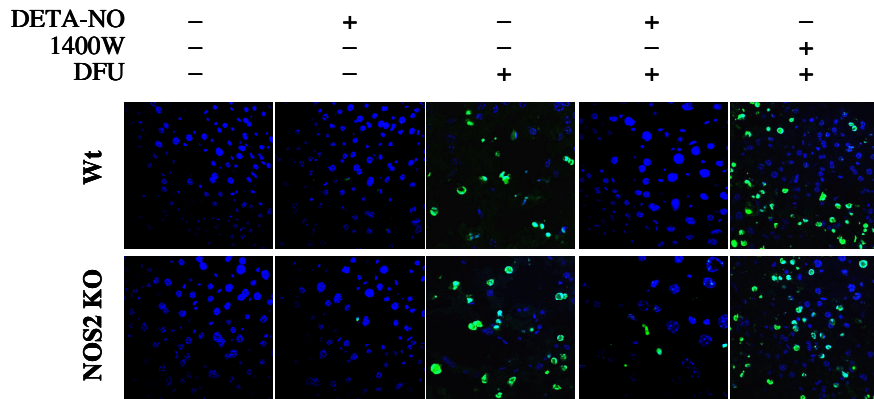


Figura 2. Daño hepático tras la PH. 24h tras la PH se determinó en plasma de los animales la actividad de alanino aminotransferasa (ALT, U/L). \* $P < 0.05$  vs. Wt o NOS-2 KO tras la PH. <sup>a</sup> $P < 0.05$  ALT plasmática de ratones NOS-2 KO vs. Wt tras PH.

2. Alto índice de apoptosis en hígado tras la PH en ausencia de NO y PGs.

Para profundizar en el mecanismo por el cual la ausencia simultánea de la síntesis de NO y PGs reducía la supervivencia en los animales tras la PH, cortes seriados de las muestras de hígado se analizaron a las 36 h tras PH. Los animales tratados con los inhibidores 1400W y DFU mostraron un alto porcentaje de células positivas para TUNEL, marcaje que detecta muerte celular por apoptosis. El tratamiento de los animales con el donador de NO, DETA-NO, ejerció una significativa protección frente a la apoptosis (figura3).

A



B

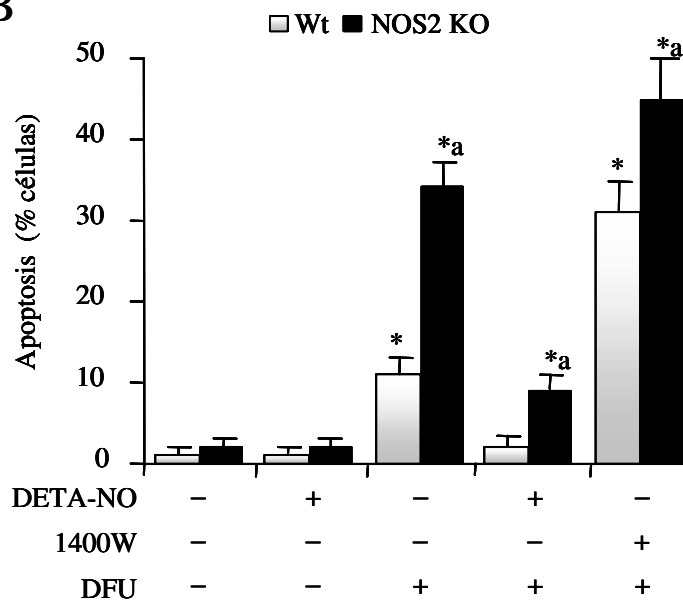


Figura 3. Núcleos apoptóticos en hígados regenerantes tras la PH. Ratones Wt y NOS-2 KO se trataron como se indica y las secciones de hígado se tiñeron con Hoescht (azul) y se analizaron por TUNEL (verde) para evaluar la apoptosis a las 36h tras PH (A). El porcentaje de células apoptóticas se cuantificó y los resultados muestran la media  $\pm$  SE de tres secciones por animal ( $n=3$ ) (B). \* $P<0.05$  vs. el correspondiente animal Wt o NOS-2 KO no tratado.  $aP<0.05$  vs. el correspondiente animal Wt tratado en idénticas condiciones.

Para evaluar mejor esta respuesta apoptótica en el hígado tras PH, se comprobaron los niveles de varios genes implicados en este proceso: las familias IAP (cIAP-1, cIAP-2 y xIAP) y Bcl-2 (Bcl-xL, Bcl-2 y Bax). Los niveles de cIAP-1 aumentaron tras la PH, un proceso que no se dió en animales tratados con DFU y 1400W, o en animales NOS-2 KO que recibieron DFU. Además, se observó un moderado aumento de cIAP-2 en estas condiciones, mientras que los niveles de xIAP, Bcl-xL, Bcl-2 y Bax se mantuvieron sin modificaciones en todos los tratamientos.

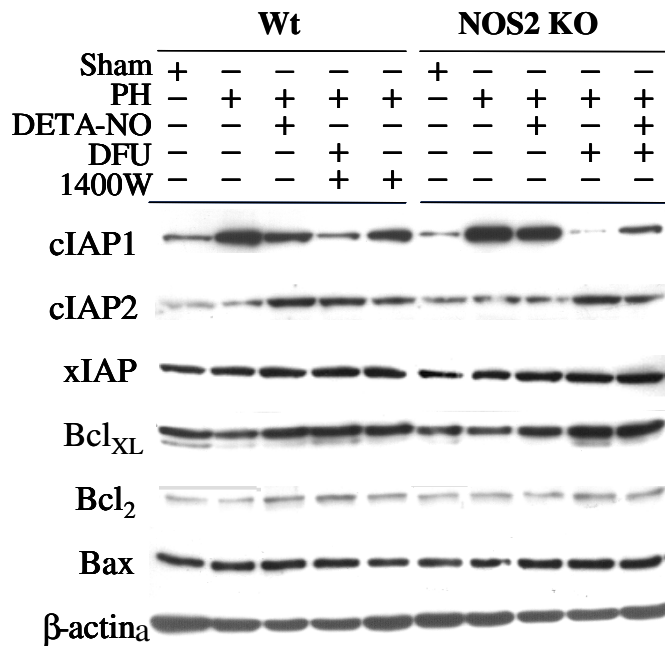


Figura 4. Niveles hepáticos de proteínas implicadas en el proceso de apoptosis tras la PH. Los niveles de IAPs y proteínas de la familia Bcl2 se determinaron por Western blot en extractos citosólicos de hígado de estos animales. Los resultados muestran un experimento representativo de tres. La β-actina se utilizó para la normalización de carga.



3. Cambios en los factores de transcripción en el hígado durante la regeneración.

La regeneración hepática tras PH se acompaña de grandes cambios en los niveles de los factores de transcripción C/EBPs. Los altos niveles de C/EBP- $\alpha$ , un factor de transcripción característico de hígado y que participa en la inhibición de la proliferación de los hepatocitos, disminuyen rápidamente tras la PH (figura 5). Este proceso se mantuvo en todas las condiciones analizadas. Sin embargo, los niveles de C/EBP- $\beta$  y  $\delta$  no aumentaron cuando la síntesis de NO y PG se encontraba inhibida. Dado que Stat-3 juega un papel importante en la regeneración hepática (Cressman et al., 1995; Li et al., 2002), se analizaron los niveles de fosfo-Stat-3 en el extracto nuclear. Los niveles de fosfo-Stat-3 fueron menores en animales NOS-2 KO que en sus Wt correspondientes (figura 5). El análisis densitométrico de Stat-3 mostró unos niveles nucleares de fosfo-Stat-3 menores en animales sin actividad NOS-2 y COX-2. Todos estos datos resultan compatibles con una respuesta regenerativa atenuada en el hígado remanente de aquellos animales que carecían de actividad NOS-2 y COX-2.

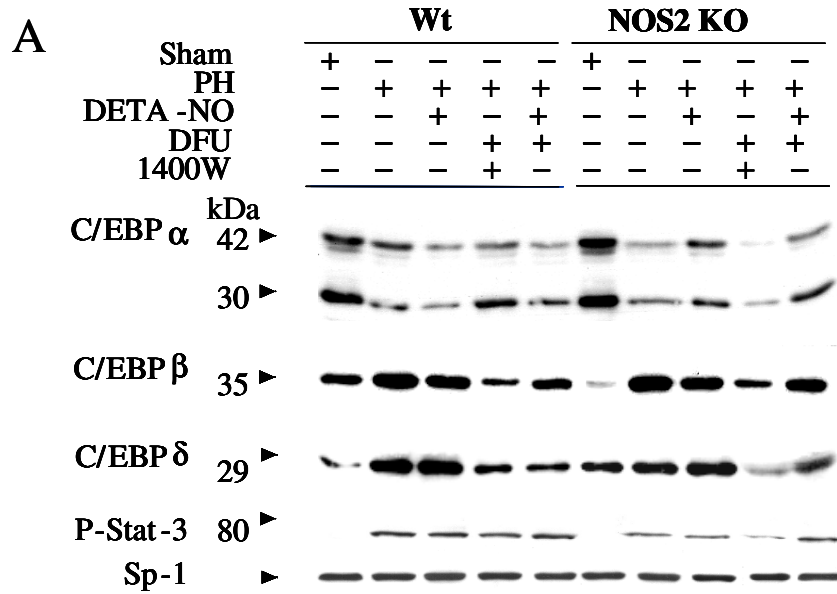


Figura 5A. Cambios tras la PH en factores de transcripción en el hígado regenerante. Los niveles nucleares de C/EBP- $\alpha$ , C/EBP- $\beta$  y C/EBP- $\delta$  se determinaron a las 24h tras la PH y los niveles de fosfo-Stat-3 a las 2h tras la PH. Los niveles de SP-1 se usaron como normalizador de carga (A). El análisis densitométrico se muestra en gráficas en la figura 5B.

B

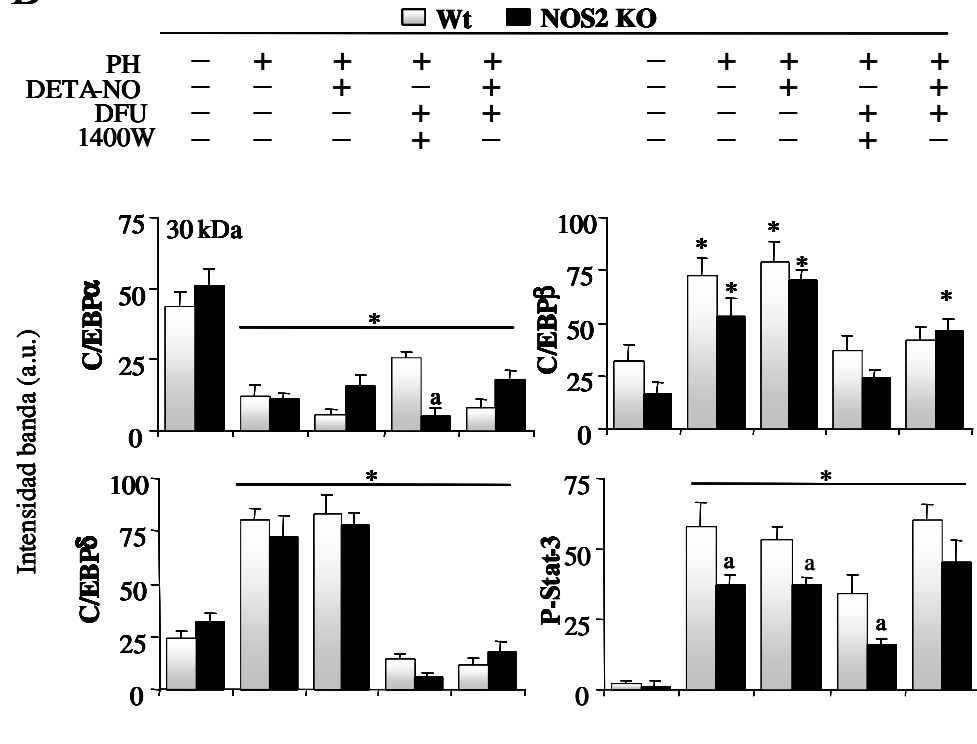


Figura 5B. Cambios tras la PH en factores de transcripción en el hígado regenerante. El análisis densitométrico (media + SE, n=3) se muestra en las gráficas. \*P<0.05 vs. la condición control del grupo Wt o NOS-2 KO respectivamente. <sup>a</sup>P<0.05 vs. el correspondiente animal Wt hepatectomizado tratado en las mismas condiciones.

4. Aumento de la supervivencia por el uso de inhibidores de caspasas.

La apoptosis aumenta en regeneración hepática cuando la actividad NOS-2 y COX-2 se encuentran inhibidas. El tratamiento de los animales tras la PH con el inhibidor general de caspasas z-VAD, aumentó notablemente la supervivencia tras la PH de los animales NOS-2 KO tratados con DFU (figura 6). Esto indica que el marcado aumento de la apoptosis tras la PH es el mecanismo que subyace a la muerte de estos animales en ausencia de las actividades NOS-2 y COX-2.

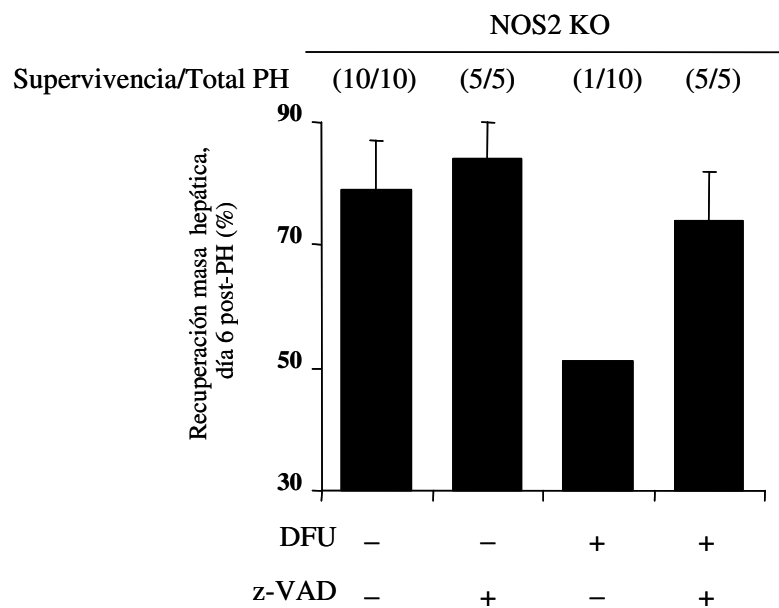


Figura 6. La inhibición de las caspasas rescata a los animales de la muerte tras la PH en ausencia de actividad de NOS-2 y COX-2. Los animales NOS-2 KO se trataron con DFU (1 mg/kg) y z-VAD (10 mg/kg) cada 12h el primer día tras la PH y cada 24h durante los 3 días siguientes. La supervivencia y la recuperación de tejido hepático se determinaron a los 6 días tras la PH. Los resultados muestran la media + SE de la recuperación hepática en los animales que sobrevivieron (número indicado entre paréntesis).

Además, cuando las secciones de tejido en regeneración se analizaron a las 48 h tras la PH se observó que un alto porcentaje de células en tejidos de ratones NOS-2 KO tratados con DFU eran poliploides. Las células eran incapaces de progresar en la división celular (figura 7), al tiempo que se encontraba aumentada la apoptosis (figura 3).

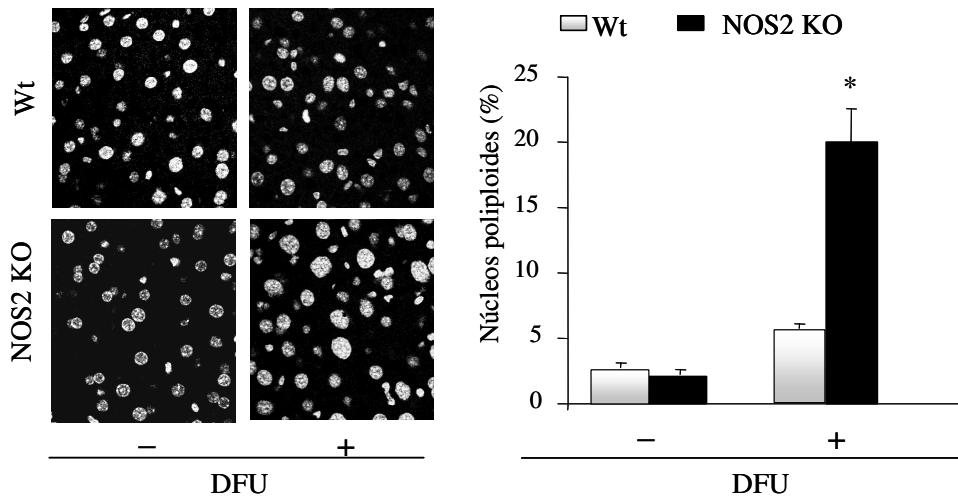


Figura 7. Aumento de células poliploides por inhibición de NOS-2 y COX-2. Las secciones de hígado de animales Wt y NOS-2 KO tratados o no con DFU (48 h tras PH) se tiñeron con Hoechst y el porcentaje de núcleos poliploides se cuantificó. Los resultados muestran la media  $\pm$  SE (3-5 secciones de 3 animales por condición). \* $P < 0.001$  vs. la condición correspondiente sin tratamiento con DFU.

5. Retraso en la progresión del ciclo celular en ausencia de NO y PGs.

El mantenimiento de la relación masa hepática/masa corporal se debe a un balance entre proliferación celular y apoptosis. Por ello, se evaluó la proliferación celular tras la PH en las diferentes condiciones analizadas. La proliferación de los hepatocitos se evaluó mediante la determinación del índice mitótico en secciones de tejido a las 48h tras la PH. El índice mitótico descendió un 75% cuando no existía actividad NOS-2 ni COX-2 (figura 8). Sin embargo, mediante el tratamiento con z-VAD se recuperaron los niveles de proliferación celular. Esto indica una compensación de la respuesta proliferativa debido a la inhibición de la apoptosis, mediante la inhibición de la activación de caspasas.

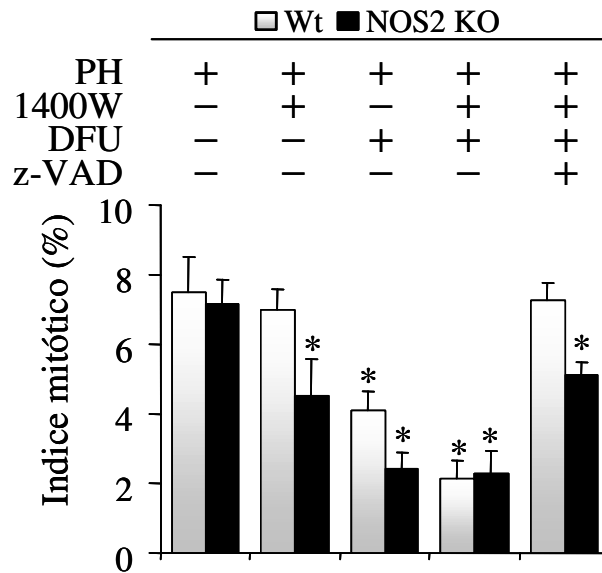


Figura 8. Efecto de la supresión de la síntesis de NO y PGs en la proliferación tras la PH. Los animales Wt y NOS-2 KO se trataron como se indica y se determinó el número de células mitóticas a 48 h tras PH. Los resultados muestran la media  $\pm$  SE de tres secciones ( $n=3$  animales por condición). \* $P<0.05$  vs. el correspondiente Wt o NOS-2 KO sin tratamiento, tras la PH.

Determinadas proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular también varían su expresión tras la PH indicando la extensión del proceso de proliferación. Así tras la Ph se produce un aumento de los niveles de ciclina D<sub>1</sub>, ciclina E y PCNA.

Por ello, se determinaron los niveles de ciclina D<sub>1</sub>, ciclina E y PCNA en extractos de tejido a las 48 h post-PH. Los niveles de ciclina D<sub>1</sub> fueron mucho menores en las muestras de ratones NOS-2 KO que en los

correspondientes Wt. En animales tratados con DFU y 1400W, los niveles de ciclina D<sub>1</sub> y E fueron mucho menores que en los Wt y existía un marcado descenso en los niveles de PCNA. Estos cambios claramente sugieren un retraso o disminución de la proliferación. Los niveles de PCNA en muestras de ratones NOS-2 KO tras PH fueron notablemente menores que los registrados en Wt, pero aumentaron tras la administración de DETA-NO. Esta dependencia de NO de los niveles de expresión de PCNA puede explicar la baja capacidad proliferativa observada en animales carentes del gen de NOS-2. Sin embargo, la degradación de IκBα como marcador temprano de regeneración hepática (Michalopoulos y DeFrances, 1997; Fausto, 2000), se observó a los 30 min. en todos los casos analizados. El mantenimiento de este marcador temprano de la activación de la proliferación sugiere un fallo de señales más tardías que desencadenan la proliferación celular e inhiben la apoptosis en el tejido remanente. De acuerdo con esta observación, los niveles plasmáticos de TNFα, otro marcador temprano de regeneración, medidos 2 h tras PH fueron similares en las condiciones analizadas (figura 9). Los niveles plasmáticos de PGE<sub>2</sub> medidos a las 24h post-PH reflejaron el efecto inhibitorio de DFU sobre la actividad COX-2.



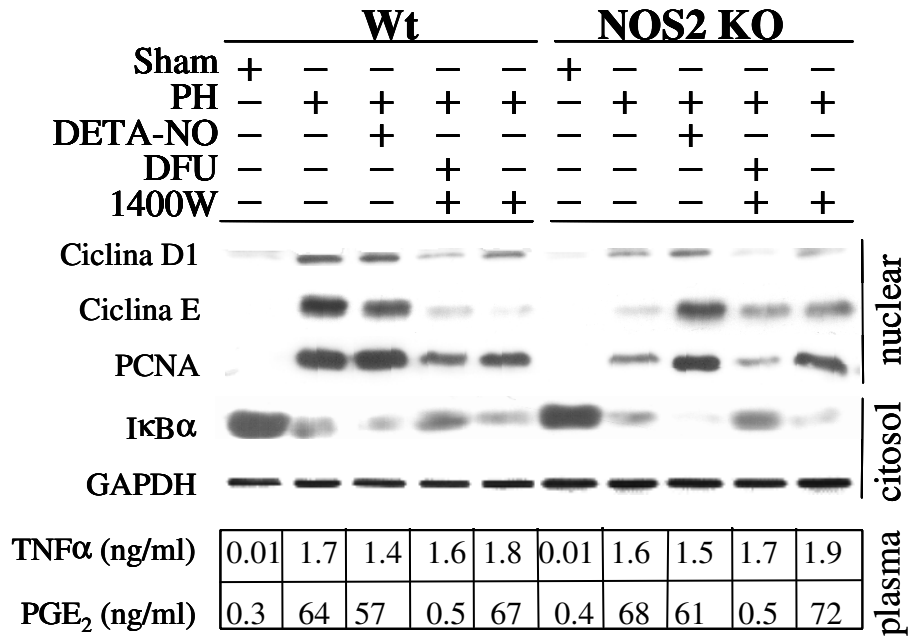


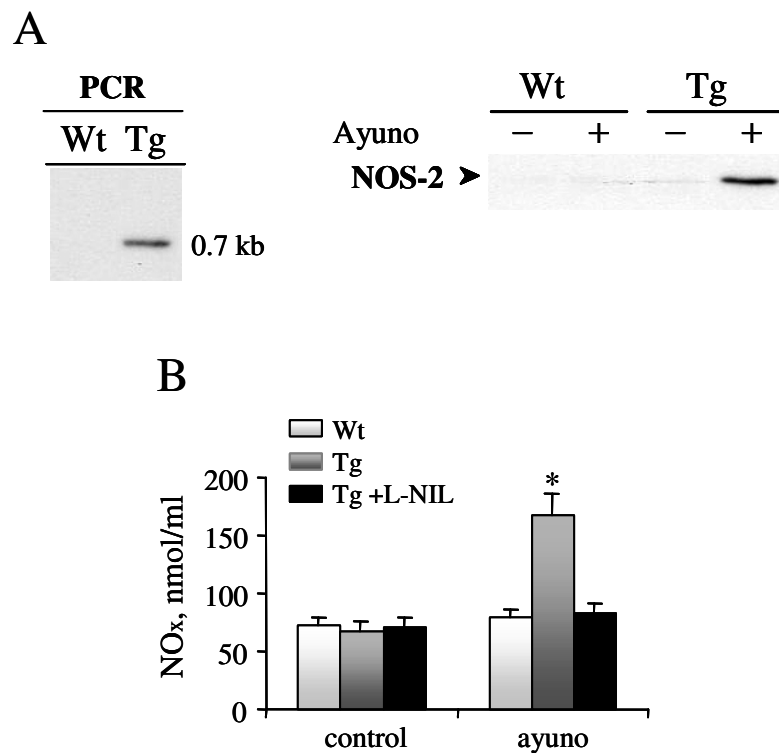
Figura 9. Efecto de la supresión de la síntesis de NO y PG en la progresión del ciclo celular tras la PH. Los niveles de ciclina D1 y E y de PCNA se determinaron en extractos celulares obtenidos a las 48 h, y los niveles de IκBα a los 30 min, respectivamente, tras la PH. Los niveles de GAPDH se usaron para normalizar la carga de proteína. Los niveles plasmáticos de TNF-α y PGE<sub>2</sub> se determinaron por duplicado a las 2h y 24h respectivamente tras PH. Los resultados muestran una imagen representativa de tres experimentos y la media de TNF-α y PGE<sub>2</sub> de 3 animales por condición.

6. La síntesis hepática endógena de NO retrasa la recuperación tras la PH.

Dado que el NO regula la cinética de la regeneración hepática y protege a los hepatocitos de la apoptosis, se planteó determinar si la síntesis de NO en hígado en momentos previos a la PH podría resultar beneficioso para la recuperación del tejido hepático. Para ello, se estudió la regeneración hepática utilizando dos aproximaciones experimentales: 1) un modelo de ratón transgénico que sobreexpresa NOS-2 en hígado y 2) un modelo de sobreexpresión de NOS-2 en hígado tras la transfección hidrodinámica.

Los ratones transgénicos PEPCK-NOS-2 expresan NOS-2 en condiciones de ayuno. La presencia del transgén de NOS-2 en los animales, fue determinada mediante un análisis por PCR de DNA de la cola del ratón, como se describe en material y métodos. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta estándar durante su desarrollo. La expresión del transgén inducible se consiguió sometiendo a los animales a ayuno durante la noche anterior al experimento, junto a sus respectivos controles. La presencia de la proteína NOS-2 en hígado fue determinada mediante análisis por Western blot. Los niveles de NOS-2 fueron indetectables en animales Wt y Tg alimentados o en Wt sometidos a ayuno, y sin embargo la proteína fue claramente detectable en animales transgénicos sometidos a ayuno durante la noche (figura 10A).

La capacidad del transgén para expresar la enzima NOS-2 funcional en animales ayunados, se determinó midiendo los niveles de nitratos y nitritos ( $\text{NO}_x$ ) en plasma tras el ayuno, utilizando el método de Griess (Hortelano et al., 1999). Esta respuesta fue específica ya que fue inhibida mediante el tratamiento con el inhibidor selectivo de NOS-2, L-NIL (figura 10B).



*Figura 10. Caracterización de los ratones NOS-2 transgénicos y funcionalidad de la construcción PEPCK-NOS-2. Los animales transgénicos tipados por PCR de DNA de la cola, fueron sometidos a ayuno y la expresión de NOS-2 en el hígado fue comprobada por Western Blot (A). La capacidad del transgén para expresar una enzima NOS-2 funcional se determinó midiendo los niveles de nitratos y nitritos (NOx) en plasma en los animales, por el método de Griess. Los resultados muestran la media de cuatro experimentos. \* $P < 0.001$  vs. Wt en las mismas condiciones (B). El papel del NO endógeno y la importancia de la cinética de su liberación en la regeneración hepática tras la PH se estudió usando este modelo animal que portaba el transgén NOS-2 bajo el control del promotor de la PEPCK. La expresión de NOS-2 en el hígado en los animales Tg ayunados se encontraba aumentada antes de la operación*

(figura 11). La proteína fue detectable en todos los casos estudiados al menos durante el periodo de 24h inmediatamente posterior a la PH.

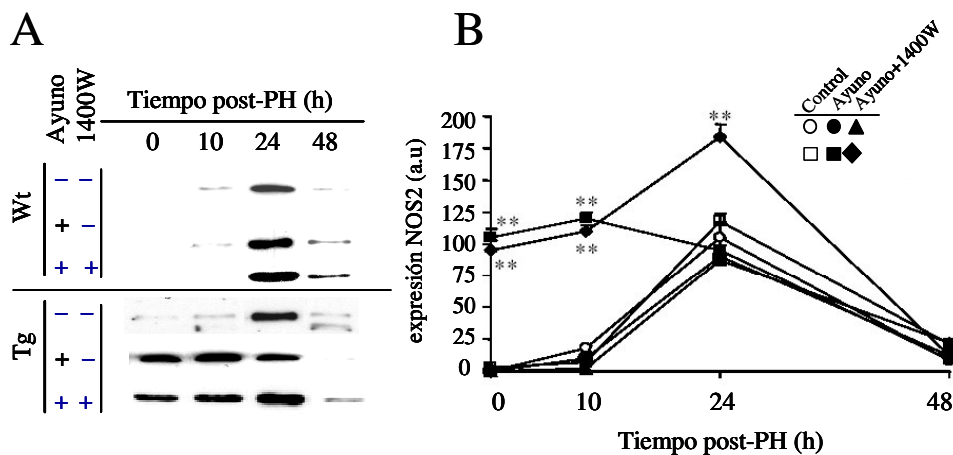


Figura 11. Expresión de la proteína NOS-2 en ratones Wt y Tg tras la PH. Los animales portadores del transgén de NOS-2 bajo el control del promotor de la PEPCK fueron ayunados durante la noche para favorecer la expresión del transgén y hepatectomizados al día siguiente. Los niveles de proteína NOS-2 se analizaron por Western Blot en extractos citosólicos de hígado a diferentes tiempos tras la cirugía (A.) El análisis densitométrico de la expresión de NOS-2 muestra la media  $\pm$  SE de cuatro experimentos (B). \*\* $P < 0.005$  vs. su correspondiente condición con alimentación ad libitum a los tiempos indicados.

Los animales, tanto Wt como Tg, sobrevivieron tras la PH, independientemente de su condición nutricional (alimentados o ayunados durante la noche anterior a la operación). Sin embargo, la presencia de NOS-2 hepática tras el ayuno en los animales Tg, causó un retraso en la recuperación de masa hepática observada a los 5 días tras la PH. La

recuperación de masa hepática fue completa a los 10 días post-PH en estas condiciones.

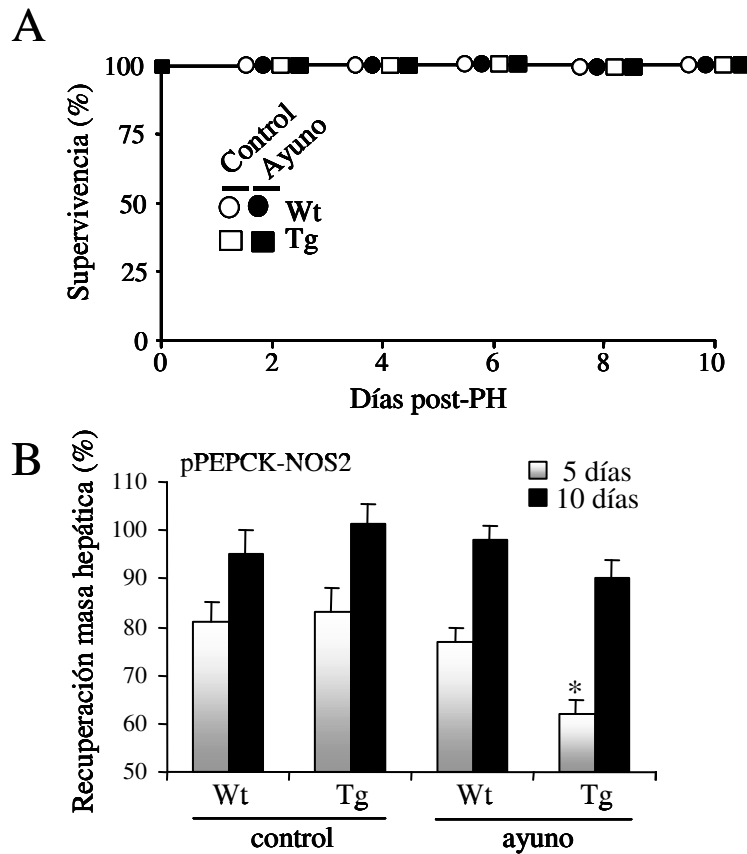


Figura 12. La expresión sostenida de NOS-2 en hígado retrasa la recuperación tras la PH. Los animales PEPCK-NOS-2 transgénicos fueron hepatectomizados tras ser sometidos a ayuno. La tasa de supervivencia de los animales en cada grupo ( $n=7$  por condición) fue seguida hasta 10 días tras la PH (A). La masa hepática recuperada fue evaluada a los 5 y 10 días tras PH, existiendo un retraso significativo en la recuperación a los 5 días, pero no a los 10 días tras la PH (B). Los resultados muestran la media  $\pm$  SE. \* $P<0.005$  vs. la condición correspondiente con alimentación ad libitum a los tiempos indicados.

Para analizar más en detalle los mecanismos del retraso en la recuperación de masa hepática en los animales Tg, se estudiaron aspectos concretos de la señalización inmediata tras la PH.

La activación de NF- $\kappa$ B tras la PH, analizada por EMSA, muestra un retraso en los animales transgénicos sometidos a ayuno, una situación que no se observa en los animales Tg alimentados *ad libitum*, ni en los animales Wt. De acuerdo con los datos de EMSA, los niveles de p65 en el núcleo fueron mucho menores en los animales transgénicos sometidos a ayuno que en los animales Wt en ayuno o en animales alimentados *ad libitum*. En paralelo a la menor translocación de p65 al núcleo tras la PH, la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  estaba retrasada en los animales que expresaban el transgén de NOS-2. La activación de Stat-3 fue determinada debido a la implicación de este factor de transcripción en el control de la regeneración hepática (Cressman et al., 1995; Rai et al., 1996). Una reducción significativa de la fosforilación de Stat-3 se observó en los animales Tg tras la PH (figura 13).

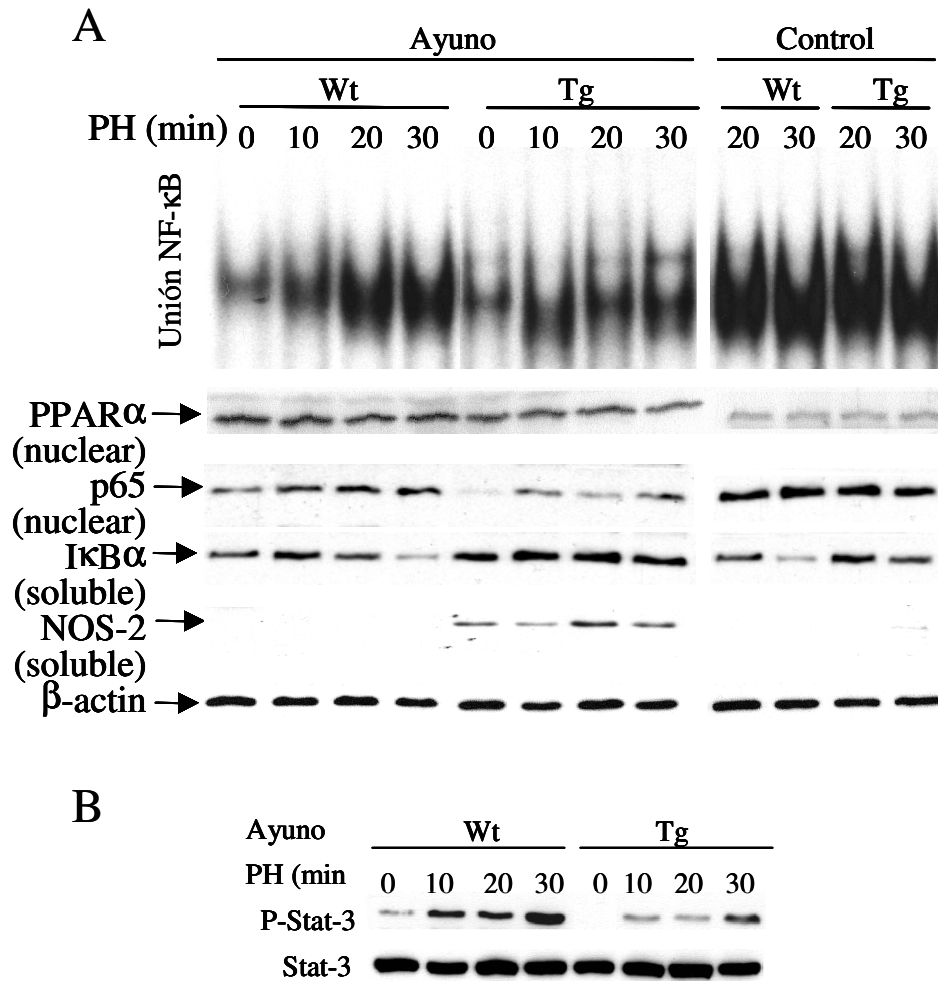
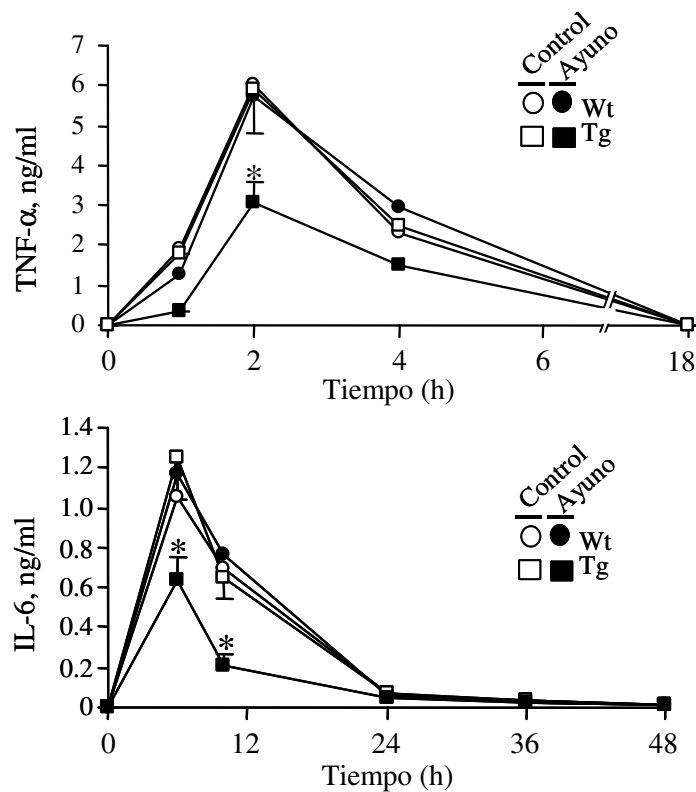




Figura 13. La producción sostenida de NO en hígado inhibe la señalización temprana de la regeneración hepática tras la PH. La activación temprana de NF- $\kappa$ B tras la PH fue determinada por EMSA. Los niveles de p65 se determinaron en extractos nucleares y los niveles de I $\kappa$ Ba y NOS-2 en extractos citosólicos por Western blot. Los niveles de PPAR- $\alpha$  se utilizaron para comprobar la igualdad de carga en los EMSA y la  $\beta$ -actina se utilizó para normalizar la carga de proteína en Western Blot (A). La fosforilación de Stat-3 en Y705 y la cantidad total de Stat-3 se determinó mediante Western Blot en extractos totales obtenidos a los tiempos indicados (B). Los resultados muestran un experimento representativo de tres. Uno de los aspectos más estudiados de la regeneración hepática es su



puesta en marcha tras la PH. Las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-6, son componentes esenciales en la señalización temprana que inicia la regeneración hepática. Los niveles de estas citoquinas en plasma se analizaron a los tiempos indicados, mostrando en los animales transgénicos en condiciones de ayuno,

unos niveles reducidos en ca. 50% en cada caso respecto a sus animales controles alimentados *ad libitum*.

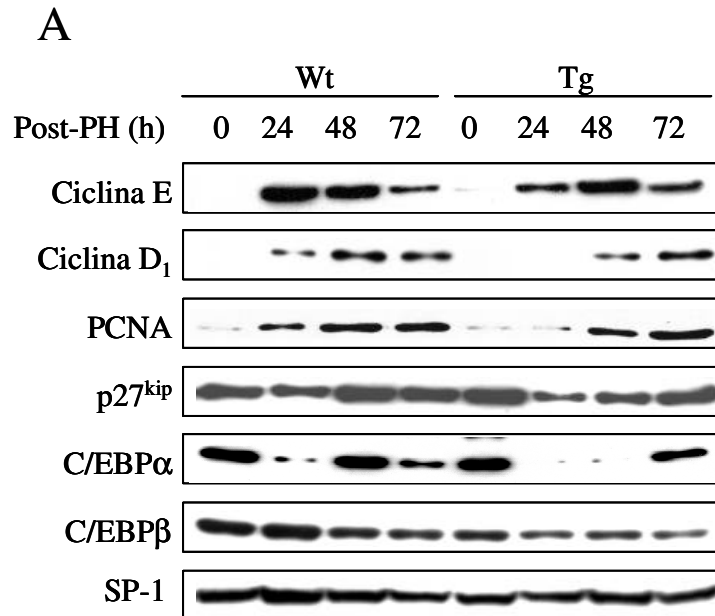
*Figura 14. Los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 se encuentran disminuidos en animales transgénicos tras la PH. Los niveles plasmáticos de estas citoquinas se midieron a diferentes tiempos tras la PH, encontrándose significativamente reducidos en los animales transgénicos sometidos a ayuno en ca. 50%. \* $P < 0.01$  vs. la condición correspondiente en condiciones de alimentación *ad libitum* a los tiempos indicados.*

---

7. La síntesis local de NO retrasa la proliferación de hepatocitos pero protege frente a la apoptosis.

Aunque todos los tipos celulares existentes en el hígado proliferan tras la PH, son los hepatocitos los primeros en proliferar y los que consiguen recuperar una masa hepática adecuada al peso corporal del animal (Fausto, 2000).

Teniendo en cuenta los resultados previos, investigamos los efectos de la síntesis sostenida de NO en la proliferación de los hepatocitos tras la PH. Como muestra la figura siguiente, el aumento en los niveles de ciclina E, ciclina D<sub>1</sub> y PCNA se encontraba retrasado en los animales Tg comparados con sus Wt correspondientes en las mismas condiciones. La misma situación se observaba para la cinética de disminución y resíntesis del factor de transcripción C/EBP- $\alpha$ . El aumento de los niveles de C/EBP- $\beta$  característicos de las primeras etapas de la proliferación de hepatocitos se encontraba atenuado en los animales Tg. Todos estos parámetros indican que existe una menor proliferación celular.



*Figura 15A. Efecto del NO en la progresión del ciclo celular tras la PH. Animales Wt y Tg se sometieron a PH y a los tiempos indicados se procesaron muestras de tejido hepático remanente, para determinar los niveles de ciclinas E y D<sub>1</sub>, PCNA, p27<sup>kip</sup> y C/EBP- $\alpha$  y  $\beta$ . La imagen muestra un experimento representativo. Los niveles de SP-1 se usaron para normalizar la carga de proteína.*

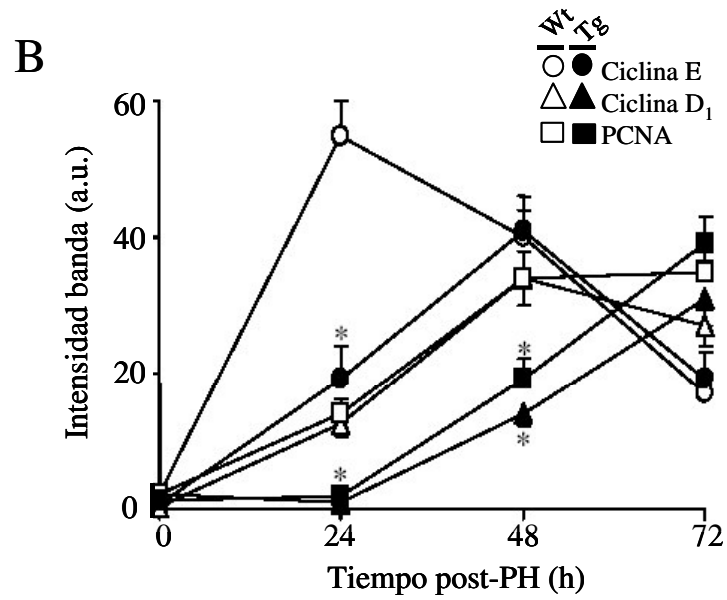


Figura 15B. Efecto del NO en la progresión del ciclo celular tras la PH. Los análisis densitométricos muestran la media  $\pm$  SE (n=5). \*P<0.01 vs. la condición Wt correspondiente a los tiempos indicados.

La incorporación de BrdU como un índice de proliferación celular se determinó a los tiempos indicados por ELISA en extractos de tejido hepático. Los animales fueron inyectados con 10 mg/kg de BrdU (i.p.) 3h antes de ser sacrificados. De acuerdo con los datos anteriores, que indicaban un menor proliferación celular, una marcada disminución de la incorporación de BrdU se observó en animales Tg tras la PH (figura 16).

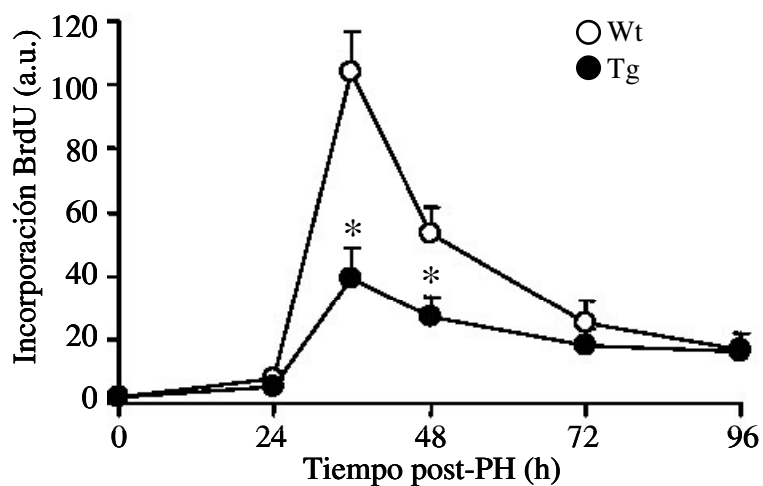


Figura 16. Determinación de la proliferación celular tras la PH. 3h antes de sacrificar los animales, se les administró BrdU (10 mg/kg; i.p.). La incorporación de BrdU fue determinada por ELISA. Se determinó la media  $\pm$  SE de tres animales por condición. \* $P < 0.01$  vs. el Wt correspondiente a los tiempos indicados.

Sin embargo, este retraso en la proliferación se acompañó de un menor porcentaje de apoptosis en el hígado de los animales Tg en comparación con sus Wt. Se analizaron por TUNEL varias secciones no consecutivas de tejido hepático remanente a las 24h tras la PH. En los animales Tg apenas había células apoptóticas, así como muy baja actividad de caspasas. Resultados similares se observaron al tratar a los animales con DETA-NO, que les protegió de la apoptosis en estos momentos iniciales tras la PH, lo que indica de nuevo la importancia del NO como protector de la apoptosis en el hígado en regeneración. Más aún, la inhibición de la actividad NOS-2 mediante el inhibidor selectivo 1400W, produjo un aumento significativo del número de células apoptóticas, un efecto que fue revertido al administrar el donador de NO, DETA-NO.

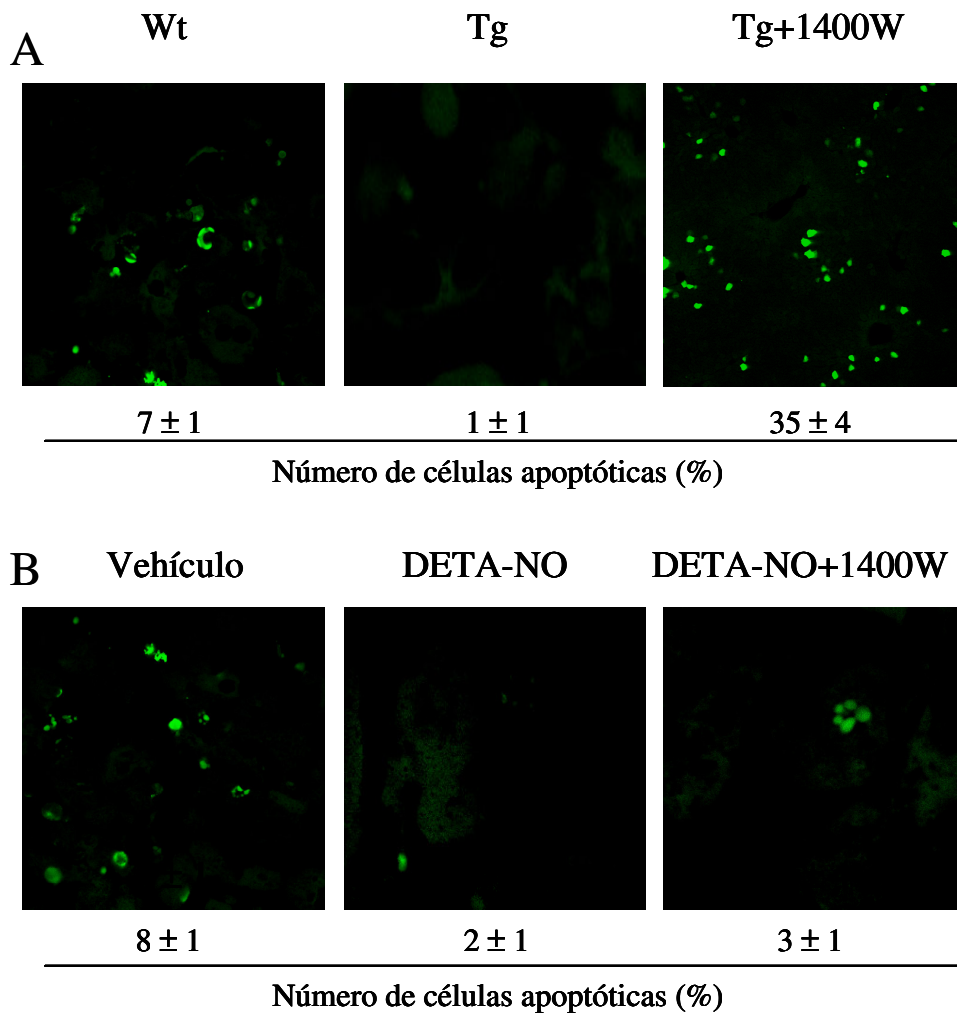


Figura 17. Efecto del NO en la apoptosis tras la PH. Los animales Tg fueron tratados con el inhibidor selectivo de NOS-2, 1400W (20mg/kg), 1h previa a la PH (A). Los animales Wt recibieron salino (vehículo), el donador de NO, DETA-NO (15 mg/kg) o una combinación de DETA-NO + 1400W (B). Secciones de tejido hepático remanente fueron analizadas por TUNEL a las 24h tras la PH, para determinar el número de células apoptóticas. Se analizaron tres secciones de tejido no consecutivas (n=3 animales por condición). Los resultados muestran la media  $\pm$  SE expresado como porcentaje.



8. La expresión transitoria de NOS-2 en hígado retrasa la regeneración hepática tras la PH.

Además del modelo de animal Tg (en el que se producía la expresión del transgén de NOS-2 tras el ayuno) se utilizó otro modelo en este estudio, que permite la expresión de NOS-2 en hígado mediante una transfección hidrodinámica *in vivo* (Liu et al., 1999). Para este experimento se utilizó una construcción GFP-NOS-2 y como control GFP en la misma construcción (Navarro-Lerida et al., 2004). En la figura 18, se muestra como NOS-2 fue expresada en hígado, reflejada por la fluorescencia de la proteína GFP asociada. Para evaluar el daño producido por la inyección hidrodinámica se determinaron los niveles de ALT a las 24h tras la transfección. Los valores obtenidos fueron similares en los animales transfectados con GFP y GFP-NOS2, y en el rango de los valores de los animales que recibieron salino por inyección hidrodinámica. Esta NOS-2 transfectada y que se expresó en hígado, fue activa como se muestra por los valores de NO<sub>x</sub> determinados en plasma, que se incrementaron significativamente en los animales transfectados con GFP-NOS-2 pero no en los animales transfectados con GFP.

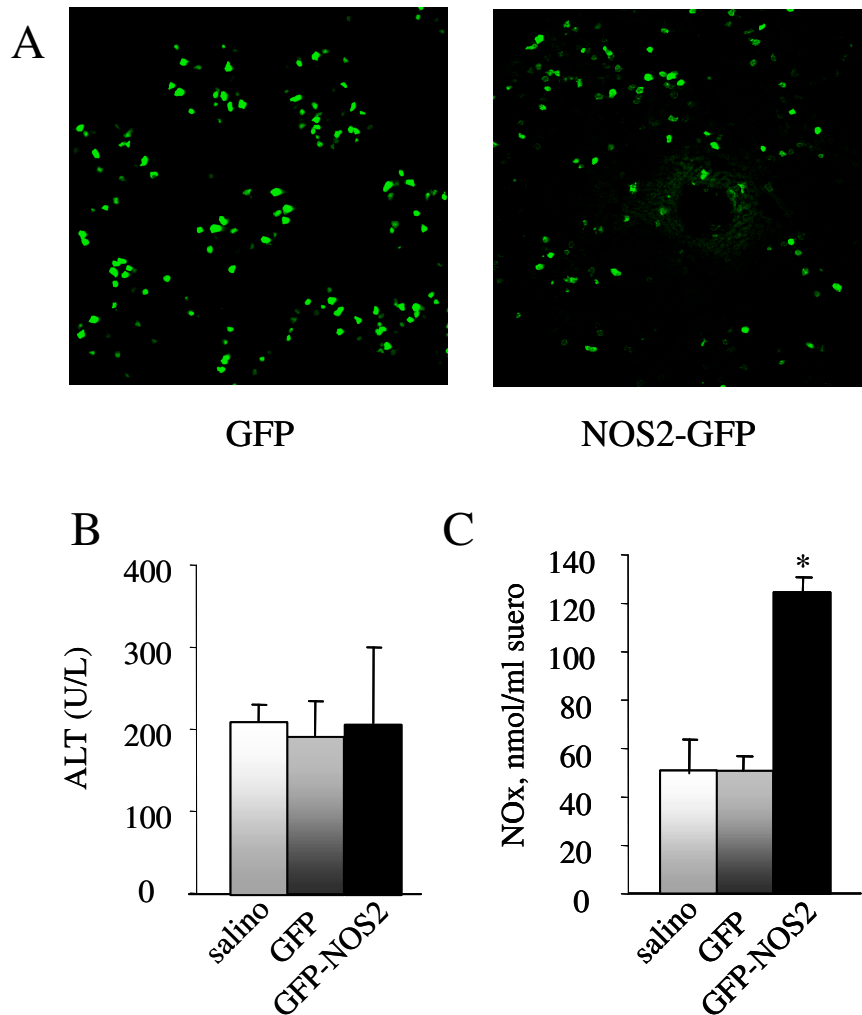


Figura 18. Expresión de NOS-2 en hígado mediante transfección hidrodinámica. Los animales fueron transfectados in vivo con plásmidos codificantes para GFP o para la proteína de fusión GFP-NOS-2. Las secciones de tejido hepático fueron analizadas a las 24h tras la inyección para verificar la expresión de GFP o GFP-NOS-2, respectivamente (A). El daño hepático causado por la inyección se refleja en los niveles séricos de ALT (B) y la actividad de la enzima NOS-2 se determinó como los niveles plasmáticos de NOx (C). Los resultados muestran la media  $\pm$  SE. \* $P < 0.001$  vs. la condición GFP.

Al igual que en el modelo de animales transgénicos utilizados, los cambios en los niveles de los C/EBPs se encontraban claramente retrasados cuando el NO era liberado previamente a la PH, comparando los animales transfectados con la construcción GFP-NOS2 frente a los transfectados con GFP. Además, el incremento en los niveles de ciclina D<sub>1</sub> y PCNA y la incorporación de BrdU también fueron menores debido a la liberación previa de NO en hígado.

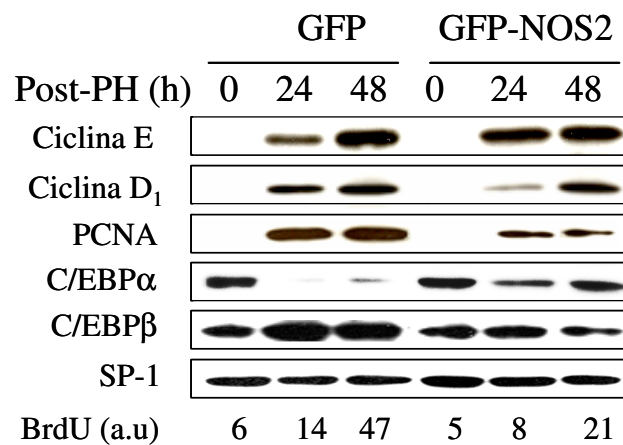


Figura 19. Efecto de la transfección hidrodinámica de NOS-2 sobre la proliferación celular tras PH. Las proteínas de ciclo celular fueron analizadas por Western blot a los tiempos indicados tras la PH. Las imágenes muestran un resultado representativo de tres. La incorporación de BrdU fue evaluada por ELISA.

Cuando se determinó la masa hepática recuperada, se comprobó que la expresión de NOS-2 en hígado tras la transfección hidrodinámica retrasaba la regeneración del tejido remanente.

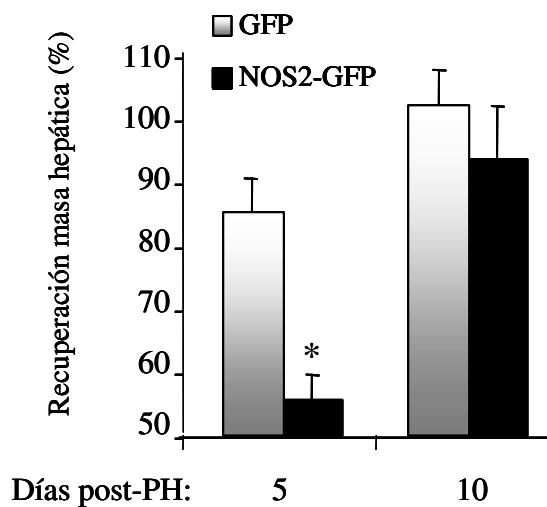


Figura 20. Efecto de la transfección hidrodinámica de NOS-2 en la regeneración hepática tras la PH. La expresión de NOS-2 en hígado previa a la PH retrasa la recuperación tras la operación. La masa hepática recuperada en animales transfectados fue evaluada a los 5 y 10 días tras PH, existiendo un retraso significativo en la recuperación a los 5 días, pero no a los 10 días tras la PH. Los resultados muestran la media  $\pm$  SE. \* $P < 0.001$  vs. la condición GFP.

Finalmente, para determinar la capacidad del NO como inhibidor de la activación de caspasas y de la apoptosis, los animales transfectados con GFP o GFP-NOS2 fueron sometidos a un daño mediado por un anticuerpo de Fas. La apoptosis mediada por Fas está restringida al hígado y es un modelo excelente para el estudio de la hepatitis fulminante. En estas condiciones se determinó la activación de las caspasas en extractos de hígado de estos animales. La figura 21, muestra como la actividad de las caspasas 3, 8 y 9 se encuentra significativamente reducida en aquellos animales en los que el NO se liberaba previamente al daño. Esto apoya los datos de trabajos previos realizados en otros modelos de experimentación en los que el NO ha mostrado su eficacia como hepatoprotector frente a diferentes daños (Fiorucci et al., 2001; Fiorucci et al., 2002; Kim et al., 2000; Mojena et al., 2001).

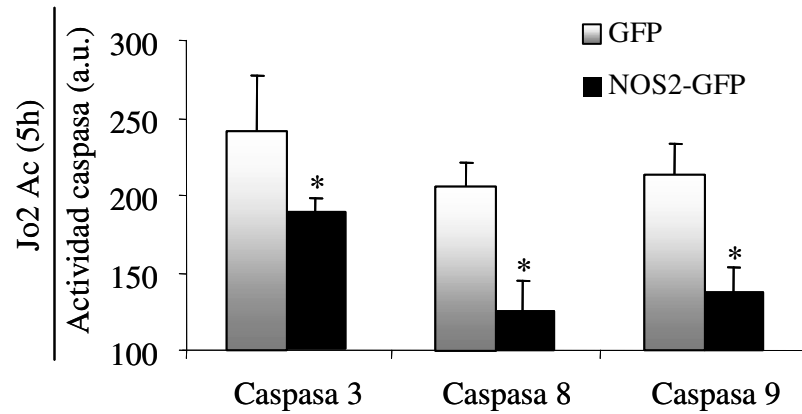


Figura 21. Efecto protector del NO frente al daño mediado por Fas. Animales transfectados no sometidos a PH fueron inyectados i.p. con el anticuerpo Jo2 (0.30 mg/g peso corporal) frente al receptor de Fas. 5h tras el estímulo los animales fueron sacrificados y las actividades caspasas se midieron en extractos de estos tejidos. Los datos muestran la media  $\pm$  SE de cinco animales por condición. \* $P < 0.001$  vs. la condición GFP.



*Discusión*

---





En vertebrados adultos, el hígado es uno de los pocos órganos corporales con capacidad de regeneración, como la médula ósea o la piel. La hepatectomía parcial (PH) (Higgins y Anderson R.M., 1931) es un modelo excelente para estudiar la respuesta del hígado ante una pérdida de capacidad funcional y para analizar la progresión del ciclo celular *in vivo*. Tras la resección quirúrgica de dos terceras partes del hígado, el tejido remanente inicia una respuesta para favorecer la proliferación celular y el crecimiento, hasta que la relación tejido hepático/masa corporal se ha recuperado a valores normales y la función hepática se ha restaurado (Fausto, 2000). La regeneración hepática es una respuesta organizada del tejido que implica cambios secuenciales en la expresión génica, producción de factores de transcripción y remodelación de la matriz extracelular (Michalopoulos y DeFrances, 1997) y que transcurre al tiempo que el órgano es capaz de mantener su funcionalidad (Taub, 2004).

La fisiopatología de la regeneración es muy compleja e implica la activación de numerosas citoquinas (entre ellas, TNF- $\alpha$  e IL-6), factores de transcripción (c-Myc, c-Fos, c-Jun, NF- $\kappa$ B, AP1, Stat-3, C/EBPs) y factores de crecimiento (HGF, TGF- $\alpha$ , EGF) (Diehl, 2000; Fausto, 2000; Taub, 2004).(Fausto et al., 1995; Michalopoulos y DeFrances, 1997)

Entre el gran número de señales implicadas en la progresión del ciclo celular en los hepatocitos tras la PH, se encuentra el aumento de la expresión de la proteína inducible NOS-2 en el hígado remanente (Obolenskaya et al., 1994a; Hortelano et al., 1995; Diaz-Guerra et al.,

1997). El efecto del NO en los hepatocitos depende principalmente de la concentración y del tiempo de exposición al NO. Se ha demostrado que en general, bajas dosis de NO pueden ejercer efectos hepatoprotectores, mientras que dosis más altas pueden ser citotóxica (Kim et al., 1997b; Kim et al., 2000). Usando el modelo de PH en ratones carentes del gen de NOS-2, Rai et al. demostraron que el NO es importante para la regeneración hepática ya que los hepatocitos sufren un proceso temprano de apoptosis y menor proliferación cuando la inducción de NOS-2 es impedida en el hígado (Rai et al., 1998), a pesar de la inducción normal de TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, IL-6 y Stat-3,

De igual manera, COX-2, una enzima también inducible implicada en inflamación y cuya regulación es similar a la de NOS-2, aumenta su expresión tras la PH. COX-2 normalmente no se expresa en hepatocitos adultos en respuesta a diferentes estímulos, y esto parece estar relacionado con los altos niveles de C/EBP- $\alpha$  existentes en hígado (Callejas et al., 2000). Tras la PH se produce una disminución en los niveles de C/EBP- $\alpha$  y se induce la expresión de COX-2 en el tejido remanente (Casado et al., 2001).

Datos previos y los datos aquí presentados, indican que la ausencia de actividad NOS-2 (Rai et al., 1998) o COX-2 (Casado et al., 2001) retarda significativamente la regeneración tras PH. En vista de estos datos, centramos nuestro interés en el estudio del papel de la expresión de las enzimas NOS-2 y COX-2 en el hígado remanente tras la PH, y su posible cooperación en el proceso regenerativo.

A pesar de la gran cantidad de señales implicadas en el proceso regenerativo, sólo un número reducido de genes ha resultado ser imprescindible para que el proceso de regeneración se complete con éxito. Sin embargo, la falta simultánea de varias señales que participan en la regeneración puede impedir que el proceso regenerativo se complete. Así, cuando se estudió la regeneración post-PH en animales carentes de NOS-2 (NOS-2 KO), tratados con un inhibidor selectivo de COX-2 (DFU), las tasas de mortalidad de los animales fueron muy altas. La mayoría de animales murieron entre los días 2-4 tras la PH, reflejando una incapacidad del tejido para recuperarse tras la operación. Como aspectos más relevantes del daño hepático tras la PH, en ausencia de actividad NOS-2 y COX-2, existía un proceso apoptótico extendido en hígado y bajos niveles de proliferación de los hepatocitos.

Existen pocos modelos animales donde el proceso de regeneración hepática se encuentre alterada hasta resultar finalmente en altas tasas de muerte de los animales tras la operación. Por ejemplo, en animales carentes de IL6 (Cressman et al., 1996) o en animales carentes de IGFBP-1 (Leu et al., 2003a), la PH resultó en un alto porcentaje de mortalidad, aunque los datos de mortalidad variaron según las condiciones experimentales (Sakamoto et al., 1999). Asimismo, los ratones que carecen de citoqueratina 8, mueren poco tiempo tras la PH (entre los días 1-2) (Loranger et al., 1997). Los hepatocitos poseen como citoqueratinas (CK), sólo la 8 y la 18. Quizá la CK 8 es un componente estructural esencial para los hepatocitos pero su deficiencia sólo muestra su efecto negativo cuando los hepatocitos se preparan para la replicación. Probablemente, los cambios estructurales necesarios para

la replicación no tienen lugar y esto impide la división celular. En estos casos citados, aparece un proceso exacerbado de necrosis y/o apoptosis, que conduce a un fallo hepático y la muerte de estos animales. También la sobreexpresión de una forma truncada de I $\kappa$ B- $\alpha$ , que actúa como superrepressor de la disociación de I $\kappa$ B- $\alpha$  de NF- $\kappa$ B e inhibe la activación de NF- $\kappa$ B, conduce a una apoptosis masiva en los hepatocitos tras la PH (Iimuro et al., 1998). Este hecho confiere gran relevancia a la inhibición de la apoptosis como un mecanismo de supervivencia tras un daño hepático. En los animales carentes de TNFR-1, esta deficiencia provoca altas tasas de mortalidad tras ser sometidos a PH (Yamada et al., 1998). En determinados casos, la restauración del factor deficiente, como la administración de IL-6 en ratones IL-6<sup>-/-</sup> tras la PH, volvía a recuperar los niveles de regeneración hasta la normalidad ( Wallenius et al., 2000; Li et al., 2001).

Los animales NOS-2 KO sobreviven y finalmente regeneran el hígado, aunque presentan una cinética más retardada que sus controles correspondientes. Estos datos sugieren que el NO liberado tras la PH protege el hígado remanente del daño por citoquinas, como TNF- $\alpha$ , pero su ausencia no resulta letal para los animales tras la PH. En modelos animales carentes de algún gen, la existencia de vías de señalización redundantes o interactivas puede enmascarar su relevancia. Un determinado fenotipo tras la PH, puede agravarse y poner de manifiesto la relevancia de cierta señalización cuando falta más de una actividad, en un doble KO o con inhibición por tratamiento farmacológico. Según muestran los datos presentados, el NO podría

estar colaborando con metabolitos derivados de COX-2 para completar el proceso de regeneración.

La expresión de COX-2 se inicia a las 16h tras PH en hepatocitos, manteniéndose elevada hasta las 96 h, con un aumento de los niveles plasmáticos de PGE<sub>2</sub> (Casado et al., 2001). La falta de actividad de COX-2, bien por la inhibición farmacológica de la enzima o por la inactivación del gen en ratones COX-2 KO produce una deficiente regeneración tras la PH, mientras que su inactivación en un contexto de deficiencia de NOS-2 resultó letal.

En este modelo existe un desbalance entre apoptosis y proliferación celular en ratones NOS-2 KO tratados con el inhibidor selectivo de COX-2, DFU. Resultados similares se observaron con otros inhibidores, como rofecoxib y NS398, usados a concentraciones a las que sólo afectan a COX-2. Algunas de la señales tempranas tras la PH se mantuvieron sin cambios en estos animales, como la rápida degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  y el incremento en los niveles de TNF- $\alpha$ . Sin embargo, los cambios en la expresión de C/EBP- $\alpha$  y C/EBP- $\beta$ , y la activación de Stat-3 se atenuaron en animales tratados con DFU, señalando un retraso en el proceso regenerativo. De hecho, el tratamiento con DFU alteró la expresión de proteínas relacionadas con la regulación temprana del ciclo celular: PCNA, ciclina D1 y ciclina E.

La apoptosis masiva de los hepatocitos a las 36h post-PH se inhibió mediante la administración del inhibidor general de caspasas, z-VAD, en ese periodo crítico y aumentó significativamente la supervivencia de estos animales. En otros modelos animales, como el

daño hepático dependiente de Fas o TNF- $\alpha$ , la inhibición de las caspasas también ha demostrado tener efectos protectores frente a la apoptosis (Fiorucci et al., 2001).

La apoptosis conlleva una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que incluyen activación de las caspasas, fragmentación del DNA y disminución de los inhibidores de apoptosis (IAPs). Las caspasas, una familia de cistein-aspartato proteasas, degradan muchas proteínas vitales y activan por proteólisis a otras enzimas que contribuyen al proceso de muerte celular. La familia de los IAPs codifica proteínas que inhiben la apoptosis gracias a la inhibición de la cascada de activación de las caspasas, y por tanto, son proteínas clave en el control de la muerte celular. Las células dañadas, en hígados de ratones NOS-2 KO tratados con DFU, exhibían una notable fragmentación del DNA, evidenciado por el marcaje de TUNEL. También existían niveles disminuidos de IAP-1 en el hígado remanente de estos animales. Otras familias de proteínas implicadas en la apoptosis, como la familia de genes bcl-2, se mantuvieron sin cambios. De gran relevancia parece el hecho de que los núcleos de hígados de animales NOS-2 KO tratados con DFU mostraron un notable aumento de la ploidía a las 48h post-PH frente a los correspondientes animales controles. Este hecho está relacionado con un aumento de la síntesis de DNA pero una señalización deficiente para la mitosis, de modo que las células no pueden dividirse. Usando aproximaciones farmacológicas y genéticas se ha demostrado como la inhibición de NOS-2 con inhibidores selectivos resulta en un aumento del radical superóxido en el hígado y en una alteración de ploidía en el tejido remanente 24h tras PH (Hortelano et

al., 1995; Vos et al., 1997; Rosenfeld et al., 2000). En ratones con un déficit de NOS-2 y COX-2 la ploidía de los hepatocitos y el porcentaje de células binucleadas aumenta significativamente de manera más temprana. Esto podría llevar finalmente a limitar el proceso regenerativo cuando aún no se ha completado (Sigal et al., 1999), hecho que se agrava debido a la apoptosis tan extensa presente en el tejido a las 36h post-PH. Aunque el tratamiento con DFU indujo apoptosis en los animales Wt y también una disminución del índice mitótico –de acuerdo con los datos de retraso en la recuperación post-PH en animales COX-2 KO (Casado et al., 2001)– esto no afectó a la supervivencia de los animales. Sin embargo, la inactivación simultánea de NOS-2 (por delección génica) y COX-2 (por inhibición farmacológica) resultó letal tras la PH.

Por todo ello, la colaboración entre las señales mediadas por NO y PGs post-PH ha mostrado ser importante durante el proceso de regeneración hepática. Además de sus efectos sobre la regeneración hepática, el NO y las PGs son moléculas esenciales en la perfusión de órganos, como el hígado y también el riñón. Sin embargo, la mortalidad observada en estos animales NOS-2 KO, tratados con DFU no parecía relacionarse con un fallo renal, puesto que los niveles de creatinina (como indicador de la función renal) no presentaron diferencias significativas entre los diferentes grupos. El hecho de que la inhibición de la apoptosis mediante el tratamiento con z-VAD, fuera capaz de rescatar a los animales (NOS-2 KO + DFU) de la muerte tras PH, reafirma la hipótesis de la relevancia del NO y PGs sobre la apoptosis y no por sus posibles efectos vasoactivos. El control sobre la activación de las caspasas parece ser uno de los aspectos farmacológicos de mayor



relevancia en aquellos casos en que la regeneración es defectuosa y existe un aspecto común, la existencia de un proceso extendido de apoptosis y el fallo en la recuperación del tejido.

En otros modelos de daño hepático, como el mediado por tioacetamida, la deficiencia de actividad NOS-2 y COX-2 no indujo un mayor daño en los animales. Mientras que en este modelo el déficit de NO agravaba el daño inducido por tioacetamida y retrasaba la regeneración del tejido hepático, la inhibición de COX-2 parecía disminuir el daño hepático ocasionado por este tóxico (Fernandez-Martinez et al., 2004). No obstante, los modelos utilizados difieren mucho, ya que en el modelo de PH el tejido remanente no sufre ningún daño inflamatorio y las PGs poseen un efecto positivo sobre la progresión del ciclo celular (Casado et al., 2001; Rudnick et al., 2001).

Dado que la falta de NO durante el proceso de regeneración hepática origina un retraso en la recuperación post-PH, y que parece cooperar con metabolitos derivados de COX-2, nos propusimos determinar si el aporte de NO desde momentos previos a la PH podría facilitar el proceso de recuperación, mejorando la progresión del ciclo celular. Para ello utilizamos un modelo de ratón transgénico (PEPCK-NOS-2), que sobreexpresa NOS-2 tras un periodo de ayuno. En este modelo, se consigue una alta inducción de NOS-2 en hígado tras el ayuno, mientras que no se indujo su expresión en otros órganos como el páncreas, bazo o cerebro. Sólo una ligera expresión transitoria se observó en riñón sin causar aparentemente ningún daño al animal (Mojena et al., 2001). En otro modelo de animal transgénico que expresaba NOS-2 bajo el control del promotor de la insulina, se produjo una notable expresión de NOS-2 en células

pancreáticas, y la síntesis de NO provocó degeneración de células  $\beta$  con el consiguiente desarrollo de diabetes en los animales (Takamura et al., 1998)

La liberación de NO previamente a la PH no afectó a la supervivencia de los animales tras la resección de tejido hepático. Sin embargo, provocó un retraso en la señalización temprana tras la operación y en la recuperación de masa hepática. Esta situación también se ha descrito con otros factores que parecen desempeñar una importante función en la regeneración como la IL-6. Animales transgénicos con hiperproducción de IL-6, presentaban una menor activación de Stat-3, en parte debido al aumento de Socs3 en hígado (Campbell et al., 2001), poniendo fin a la señal proliferativa de IL-6 antes de que hubiera desempeñado su función activadora (Wustefeld et al., 2000). Este aumento notable de Socs3 por IL-6 podría bloquear su propia señalización y la de otras citoquinas. Además, la sobreexpresión de IL-6 podría también frenar los efectos de HGF mediante la inducción de PAI (Shimizu et al., 2001).

El aumento de la producción de NO en los momentos iniciales tras la PH parece estar afectando a la señalización temprana. NF- $\kappa$ B se activa de manera muy rápida tras la PH (Cressman et al., 1994), observándose cambios importantes ya los 10 min tras la operación. Sin embargo, en los animales que expresaban el transgén de NOS-2, la rápida activación de NF- $\kappa$ B estaba claramente retrasada e inhibida en los primeros 30 min. Además, la activación de citoquinas implicadas en la puesta en marcha de la regeneración, como TNF- $\alpha$  e IL-6 (Clavien, 1997; Webber et al., 1998) fue significativamente menor en los ratones transgénicos. La inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B por el NO liberado se puede deber al aumento de los

niveles de IKB $\alpha$  que se observaron sistemáticamente en los animales Tg que habían sido sometidos a ayuno. Esto se puede deber a que el NO es capaz de inhibir la actividad de la IKK2 (Castrillo et al., 2002) y también inhibe la degradación de IKB $\alpha$  a través del proteasoma (Glockzin et al., 1999).

Estos resultados indicaban que la presencia de NO retrasa o inhibe en parte las señales que ponen en marcha el proceso regenerativo, comprometiendo la proliferación de las células. De hecho, cuando se evaluaron los valores de diversas proteínas implicadas en proliferación celular (ciclinas E y D<sub>1</sub> y expresión de PCNA) se observó que la progresión de los hepatocitos en el ciclo celular estaba retrasada.

En definitiva estos datos muestran que el NO sintetizado debido a la inducción de NOS-2 tras la PH, actúa como un factor de protección y participa en la regeneración hepática, mientras que la activación de la NOS-2 y liberación de NO en hígado antes de la hepatectomía provoca un retraso e inhibición de la proliferación celular tras la PH. Se observó también un notable aumento de la ploidía de los hepatocitos indicativo de que las células no pueden progresar en el ciclo celular y dividirse (Sigal et al., 1999) limitando por tanto el proceso de recuperación post-PH.

El hígado es un órgano que mantiene una masa constante para cubrir la demanda metabólica del organismo gracias a un balance entre proliferación y muerte celular por apoptosis. Tras la PH, el NO puede estar ejerciendo un efecto protector sobre los hepatocitos frente al daño mediado por citoquinas (principalmente TNF- $\alpha$ ) y permite que la proliferación celular avance. De acuerdo con esta hipótesis, el tratamiento de animales Wt con el inhibidor selectivo de NOS-2, 1400W, inducía

mayores niveles de apoptosis en los hepatocitos tras la operación al igual que sucede en los NOS-2 KO. El NO producido en el hígado de los ratones Tg protege a los hepatocitos de la apoptosis en esta fase inicial de la recuperación.

Otro punto abordado en este trabajo fue el estudio de la contribución del NO a la inhibición de la activación de caspasas y sus consecuencias de protección frente a un daño hepático. El NO puede inhibir la activación de las caspasas directamente a través de modificaciones redox en residuos de cisteína en los centros activos de las caspasas, un proceso denominado nitrosilación (Kim et al., 1997b). Así, el NO ha demostrado ejercer efectos protectores sobre los hepatocitos en diversos modelos de lesión hepática. Por ejemplo, el daño hepático inducido con tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) es mayor en animales que carecen del gen de NOS-2 (Morio et al., 2001), y los derivados de NO han mostrado también ser protectores frente al daño hepático mediado por Fas (Fiorucci et al., 2002). La expresión de NOS-2 con un modelo de transferencia génica con adenovirus mostró también la eficiencia de este mecanismo de protección sobre la apoptosis dependiente de TNF- $\alpha$  y actinomicina D (Tzeng et al., 1998).

La apoptosis mediada por agonistas de Fas está restringida al hígado, ya que los receptores de Fas se expresan de manera constitutiva en este órgano. Por ello, constituye un excelente modelo para el estudio de la hepatitis fulminante (Ogasawara et al., 1993). El tratamiento en ratones con un anticuerpo anti-Fas, induce su muerte debido a un fallo hepático. La unión del ligando de Fas a su receptor, conlleva el reclutamiento de proteínas adaptadoras (como FADD), que llevan a la procaspasa 8 hacia la

membrana plasmática. Así se forma el complejo inductor de muerte (DISC), con el subsiguiente procesamiento de la procaspasa 8 a su forma activa (Scaffidi et al., 1998) y activación de la cascada apoptótica.

Para confirmar los datos anteriores relativos a la regeneración post-PH y para analizar el papel de la producción de NO sobre la apoptosis en el hígado, usamos otra aproximación experimental: la expresión *in vivo* de NOS-2 directamente en el hígado mediante transfección hidrodinámica. Este abordaje experimental posee la ventaja de conseguir altas tasas de expresión de un plásmido en el hígado (Liu et al., 1999). Esto hace de esta técnica un excelente modelo para conseguir estudiar efectos específicos en el hígado, sin recurrir a virus como transportadores (Berkner, 1992; Miller et al., 1993; Westwick et al., 1995; Zhang et al., 1995; Fink et al., 1996).

En este modelo de transfección hidrodinámica fue posible reproducir los datos de regeneración hepática post-PH obtenidos en el modelo transgénico. Los animales que expresaron GFP-NOS-2 en hígado tras la inyección hidrodinámica mostraron una respuesta similar a los animales transgénicos (PEPCK-NOS-2) tras la PH. Los niveles de proteínas de ciclo celular eran menores en los tejidos de animales que sobreexpresaban GFP-NOS-2 tras la inyección hidrodinámica, respecto a los niveles de los animales control. La recuperación de tejido a los 5 días estaba significativamente disminuida respecto a los controles, mientras que una recuperación total se consiguió a los 10 días post-PH.

Los animales que expresaban GFP o GFP-NOS-2 tras la inyección hidrodinámica y sin hepatectomizar, fueron posteriormente sometidos a un daño mediado por Fas. Los tejidos hepáticos de animales que expresaban

GFP-NOS-2 mostraron una protección frente a la apoptosis tras la inyección del anticuerpo monoclonal de Fas (Jo-2 mAb), con niveles más bajos de caspasas activadas, especialmente caspasa 8. La apoptosis regulada por Fas desempeña un papel importante en la patogénesis de enfermedades hepáticas inmunitarias como la hepatitis viral, el fallo hepático agudo... sugiriendo que estrategias que inhiban el sistema Fas-FasL puedan ser de valor terapéutico en el tratamiento de enfermedades hepáticas en humanos (Pinkoski et al., 2000). Uno de los principales mecanismos de protección frente a la apoptosis inducida por Fas, parece ser dependiente de la inhibición de caspasas (Fiorucci et al., 2001; Fiorucci et al., 2002). Estos datos obtenidos mediante la sobreexpresión de NOS-2 por inyección hidrodinámica confirman de nuevo la importancia del NO como factor hepatoprotector en este modelo de hepatitis fulminante mediada por Fas.

Así, la síntesis previa de NO en el hígado puede proteger a los hepatocitos de la apoptosis tras la PH o tras un daño mediado por Fas, inhibiendo la actividad de las caspasas. Sin embargo, puede también retrasar la proliferación de los hepatocitos en la regeneración tras la PH. El NO liberado previamente a la PH provoca un retraso en la señalización temprana, en la progresión del ciclo celular y en la recuperación de masa hepática tras la resección quirúrgica del 70% de la masa hepática. Por otro lado, la falta de NO también retrasa la recuperación de tejido hepático tras la PH, agravándose notablemente este hecho cuando coexiste una deficiencia de PGs sintetizadas por COX-2.

Todos estos datos en conjunto alertan sobre el uso de NO, de sus análogos o de sus inhibidores, directamente en hígado en diferentes situaciones de daño-recuperación hepática. Su uso debe, por tanto, estar

valorado con el fin de establecer el balance adecuado entre la protección frente al daño y una proliferación celular adecuada en cada situación individual, en particular en determinadas situaciones fisiopatológicas o en concomitancia con otros tratamientos farmacológicos.

*Conclusiones*

---



Como conclusiones principales de este trabajo podemos destacar:

- La supresión simultánea de NOS-2 (por delección génica) y COX-2 (por tratamiento farmacológico), resultó letal para los animales tras la PH, debido a una respuesta proliferativa disminuida y a un incremento de la apoptosis en hígado remanente. Este efecto fue revertido parcialmente por el uso de donadores de NO y de inhibidores de caspasas.
- El NO coopera con PGs sintetizadas por COX-2 en el proceso de regeneración hepática post-PH, protegiendo a los hepatocitos de la apoptosis y favoreciendo la proliferación celular adecuada para recuperar la relación masa hepática /masa corporal necesaria.
- La liberación de NO en hígado previamente a la PH, en animales transgénicos o tras la inyección hidrodinámica, no conduce a una mejor recuperación tras la PH, sino a un retraso de la misma.
- El NO protege a los hepatocitos del daño mediado por citoquinas tras la PH y los protege de la apoptosis mediada por Fas, a través de la inhibición de la activación de las caspasas.



## *Bibliografía*

---

- Albina,J.E. and Reichner,J.S. (1998). Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer Metastasis Rev.* *17*, 39-53.
- Aldeguer,X., Debonera,F., Shaked,A., Krasinkas,A.M., Gelman,A.E., Que,X., Zamir,G.A., Hiroyasu,S., Kovalovich,K.K., Taub,R., and Olthoff,K.M. (2002). Interleukin-6 from intrahepatic cells of bone marrow origin is required for normal murine liver regeneration. *Hepatology* *35*, 40-48.
- Appleby,S.B., Ristimaki,A., Neilson,K., Narko,K., and Hla,T. (1994). Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem. J.* *302* ( Pt 3), 723-727.
- Behrens,A., Sibilía,M., David,J.P., Mohle-Steinlein,U., Tronche,F., Schutz,G., and Wagner,E.F. (2002). Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver. *EMBO J* *21*, 1782-1790.
- Berasain,C., Garcia-Trevijano,E.R., Castillo,J., Erroba,E., Lee,D.C., Prieto,J., and Avila,M.A. (2005). Amphiregulin: An early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology* *128*, 424-432.
- Beraza,N., Marques,J.M., Martínez-Anso,E., Iniguez,M., Prieto,J., and Bustos,M. (2005). Interplay among cardiotrophin-1, prostaglandins, and vascular endothelial growth factor in rat liver regeneration. *Hepatology* *41*, 460-469.
- Berkner,K.L. (1992). Expression of heterologous sequences in adenoviral vectors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *158*, 39-66.
- Billiar,T.R., Curran,R.D., Ferrari,F.K., Williams,D.L., and Simmons,R.L. (1990). Kupffer cell:hepatocyte cocultures release nitric oxide in response to bacterial endotoxin. *J. Surg. Res.* *48*, 349-353.

- Bohlinger,I., Leist,M., Barsig,J., Uhlig,S., Tiegs,G., and Wendel,A. (1995a). Interleukin-1 and nitric oxide protect against tumor necrosis factor alpha-induced liver injury through distinct pathways. *Hepatology* 22, 1829-1837.
- Bohlinger,I., Leist,M., Barsig,J., Uhlig,S., Tiegs,G., and Wendel,A. (1995b). Tolerance against tumor necrosis factor alpha (TNF)-induced hepatotoxicity in mice: the role of nitric oxide. *Toxicol. Lett.* 82-83, 227-231.
- Borowiak,M., Garratt,A.N., Wustefeld,T., Strehle,M., Trautwein,C., and Birchmeier,C. (2004). Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 10608-10613.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254. 1975.
- Braun,L., Mead,J.E., Panzica,M., Mikumo,R., Bell,G.I., and Fausto,N. (1988). Transforming growth factor beta mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 1539-1543.
- Bredt,D.S., Hwang,P.M., and Snyder,S.H. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347, 768-770.
- Bredt,D.S. and Snyder,S.H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 682-685.
- Brune,B., Gotz,C., Messmer,U.K., Sandau,K., Hirvonen,M.R., and Lapetina,E.G. (1997). Superoxide formation and macrophage resistance to nitric oxide-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 7253-7258.

- Bryant,C.E., Appleton,I., and Mitchell,J.A. (1998). Vascular endothelial growth factor upregulates constitutive cyclooxygenase 1 in primary bovine and human endothelial cells. *Life Sci.* 62, 2195-2201.
- Burr,A.W., Toole,K., Chapman,C., Hines,J.E., and Burt,A.D. (1998). Anti-hepatocyte growth factor antibody inhibits hepatocyte proliferation during liver regeneration. *J Pathol.* 185, 298-302.
- Busse,R. and Mulisch,A. (1990). Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 275, 87-90.
- Cain,K. and Freathy,C. (2001). Liver toxicity and apoptosis: role of TGF-beta1, cytochrome c and the apoptosome. *Toxicol. Lett.* 120, 307-315.
- Callejas,N.A., Bosca,L., Williams,C.S., DuBois,R.N., and Martin-Sanz,P. (2000). Regulation of cyclooxygenase 2 expression in hepatocytes by CCAAT/enhancer-binding proteins. *Gastroenterology* 119, 493-501.
- Callejas,N.A., Casado,M., Diaz-Guerra,M.J., Bosca,L., and Martin-Sanz,P. (2001). Expression of cyclooxygenase-2 promotes the release of matrix metalloproteinase-2 and -9 in fetal rat hepatocytes. *Hepatology* 33, 860-867.
- Campbell,J.S., Prichard,L., Schaper,F., Schmitz,J., Stephenson-Famy,A., Rosenfeld,M.E., Argast,G.M., Heinrich,P.C., and Fausto,N. (2001). Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration. *J Clin. Invest* 107, 1285-1292.
- Carr,B.I., Hayashi,I., Branum,E.L., and Moses,H.L. (1986). Inhibition of DNA synthesis in rat hepatocytes by platelet-derived type beta transforming growth factor. *Cancer Res.* 46, 2330-2334.

- Casado,M., Callejas,N.A., Rodrigo,J., Zhao,X., Dey,S.K., Bosca,L., and Martin-Sanz,P. (2001). Contribution of cyclooxygenase 2 to liver regeneration after partial hepatectomy. *FASEB J.* *15*, 2016-2018.
- Castrillo,A., Diaz-Guerra,M.J., Hortelano,S., Martin-Sanz,P., and Bosca,L. (2000). Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. *Mol. Cell Biol.* *20*, 1692-1698.
- Chang,B., Nishikawa,M., Sato,E., and Inoue,M. (2003). Mice lacking inducible nitric oxide synthase show strong resistance to anti-Fas antibody-induced fulminant hepatitis. *Arch. Biochem Biophys.* *411*, 63-72.
- Chen,P.L., Riley,D.J., Chen,Y., and Lee,W.H. (1996). Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. *Genes Dev.* *10*, 2794-2804.
- Cheng,A.S., Chan,H.L., Leung,N.W., Liew,C.T., To,K.F., Lai,P.B., and Sung,J.J. (2002). Expression of cyclooxygenase-2 in chronic hepatitis B and the effects of anti-viral therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *16*, 251-260.
- Clavien,P.A. (1997). IL-6, a key cytokine in liver regeneration. *Hepatology* *25*, 1294-1296.
- Clemens,M.G. (1999). Nitric oxide in liver injury. *Hepatology* *30*, 1-5.
- Cornell,R.P., Liljequist,B.L., and Bartizal,K.F. (1990). Depressed liver regeneration after partial hepatectomy of germ-free, athymic and lipopolysaccharide-resistant mice. *Hepatology* *11*, 916-922.
- Cressman,D.E., Diamond,R.H., and Taub,R. (1995). Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration. *Hepatology* *21*, 1443-1449.

- Cressman,D.E., Greenbaum,L.E., DeAngelis,R.A., Ciliberto,G., Furth,E.E., Poli,V., and Taub,R. (1996). Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 274, 1379-1383.
- Cressman,D.E., Greenbaum,L.E., Haber,B.A., and Taub,R. (1994). Rapid activation of post-hepatectomy factor/nuclear factor kappa B in hepatocytes, a primary response in the regenerating liver. *J. Biol. Chem.* 269, 30429-30435.
- Curran,R.D., Billiar,T.R., Stuehr,D.J., Hofmann,K., and Simmons,R.L. (1989). Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J. Exp. Med.* 170, 1769-1774.
- Date,M., Matsuzaki,K., Matsushita,M., Tahashi,Y., Sakitani,K., and Inoue,K. (2000). Differential regulation of activin A for hepatocyte growth and fibronectin synthesis in rat liver injury. *J. Hepatol.* 32 , 251-260.
- De Groot,C.J., Ruuls,S.R., Theeuwes,J.W., Dijkstra,C.D., and Van,d., V (1997). Immunocytochemical characterization of the expression of inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in demyelinating multiple sclerosis lesions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 10-20.
- de Hemptinne,B., Lorge,F., Kestens,P.J., and Lambotte,L. (1985). [Hepatocellular hyperpolarizing factors and regeneration after partial hepatectomy in the rat]. *Acta Gastroenterol. Belg.* 48, 424-431.
- DeAngelis,R.A., Kovalovich,K., Cressman,D.E., and Taub,R. (2001). Normal liver regeneration in p50/nuclear factor kappaB1 knockout mice. *Hepatology* 33, 915-924.



- Debonera,F., Aldeguer,X., Shen,X., Gelman,A.E., Gao,F., Que,X., Greenbaum,L.E., Furth,E.E., Taub,R., and Olthoff,K.M. (2001). Activation of interleukin-6/STAT3 and liver regeneration following transplantation. *J. Surg. Res.* 96, 289-295.
- Dennis,E.A., Rhee,S.G., Billah,M.M., and Hannun,Y.A. (1991). Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB J.* 5, 2068-2077.
- Derynck,R. and Zhang,Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577-584.
- Deveraux,Q.L. and Reed,J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13, 239-252.
- Diaz-Guerra,M.J., Velasco,M., Martin-Sanz,P., and Bosca,L. (1996). Evidence for common mechanisms in the transcriptional control of type II nitric oxide synthase in isolated hepatocytes. Requirement of NF-kappaB activation after stimulation with bacterial cell wall products and phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 271, 30114-30120.
- Diaz-Guerra,M.J., Velasco,M., Martin-Sanz,P., and Bosca,L. (1997). Nuclear factor kappaB is required for the transcriptional control of type II NO synthase in regenerating liver. *Biochem. J.* 326 ( Pt 3), 791-797.
- Diehl,A.M. (2000). Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunol. Rev.* 174, 160-171.
- Diehl,A.M., Yin,M., Fleckenstein,J., Yang,S.Q., Lin,H.Z., Brenner,D.A., Westwick,J., Bagby,G., and Nelson,S. (1994). Tumor necrosis factor-alpha induces c-jun during the regenerative response to liver injury. *Am. J. Physiol* 267, G552-G561.

- Du,C., Fang,M., Li,Y., Li,L., and Wang,X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.
- DuBois,R.N., Awad,J., Morrow,J., Roberts,L.J., and Bishop,P.R. (1994). Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor-alpha and phorbol ester. *J Clin. Invest.* 93, 493-498.
- Ellis,R.E., Yuan,J.Y., and Horvitz,H.R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 663-698.
- Fausto,N. (2000). Liver regeneration. *J. Hepatol.* 32 *Suppl 1*, 19-31.
- Fausto,N. and Campbell,J.S. (2003). The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech. Dev.* 120, 117-130.
- Fausto,N., Laird,A.D., and Webber,E.M. (1995). Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J.* 9, 1527-1536.
- Fernandez-Martinez,A., Callejas,N.A., Casado,M., Bosca,L., and Martin-Sanz,P. (2004). Thioacetamide-induced liver regeneration involves the expression of cyclooxygenase 2 and nitric oxide synthase 2 in hepatocytes. *J Hepatol.* 40, 963-970.
- Fink,D.J., DeLuca,N.A., Goins,W.F., and Glorioso,J.C. (1996). Gene transfer to neurons using herpes simplex virus-based vectors. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 265-287.
- Fiorucci,S., Antonelli,E., Mencarelli,A., Palazzetti,B., Alvarez-Miller,L., Muscara,M., del Soldato,P., Sanpaolo,L., Wallace,J.L., and Morelli,A. (2002). A NO-releasing derivative of acetaminophen spares the liver by acting at several checkpoints in the Fas pathway. *Br. J. Pharmacol.* 135, 589-599.

- Fiorucci,S., Mencarelli,A., Palazzetti,B., del Soldato,P., Morelli,A., and Ignarro,L.J. (2001). An NO derivative of ursodeoxycholic acid protects against Fas-mediated liver injury by inhibiting caspase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 2652-2657.
- FitzGerald,G.A. and Patrono,C. (2001). The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N. Engl. J. Med.* 345, 433-442.
- FitzGerald,M.J., Webber,E.M., Donovan,J.R., and Fausto,N. (1995). Rapid DNA binding by nuclear factor kappa B in hepatocytes at the start of liver regeneration. *Cell Growth Differ.* 6, 417-427.
- Forman,B.M., Chen,J., and Evans,R.M. (1996). The peroxisome proliferator-activated receptors: ligands and activators. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 804, 266-275.
- Fu,J.Y., Masferrer,J.L., Seibert,K., Raz,A., and Needleman,P. (1990). The induction and suppression of prostaglandin H<sub>2</sub> synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J. Biol. Chem.* 265, 16737-16740.
- Fujita,J., Marino,M.W., Wada,H., Jungbluth,A.A., Mackrell,P.J., Rivadeneira,D.E., Stapleton,P.P., and Daly,J.M. (2001). Effect of TNF gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Surgery* 129, 48-54.
- Funk,C.D. (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294, 1871-1875.
- Funk,C.D., Funk,L.B., Kennedy,M.E., Pong,A.S., and FitzGerald,G.A. (1991). Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J* 5, 2304-2312.

- Gallois,C., Habib,A., Tao,J., Moulin,S., Maclouf,J., Mallat,A., and Lotersztajn,S. (1998). Role of NF-kappaB in the antiproliferative effect of endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha in human hepatic stellate cells. Involvement of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 273, 23183-23190.
- Gallucci,R.M., Simeonova,P.P., Toriumi,W., and Luster,M.I. (2000). TNF-alpha regulates transforming growth factor-alpha expression in regenerating murine liver and isolated hepatocytes. *J. Immunol.* 164, 872-878.
- Gasparini,G., Longo,R., Sarmiento,R., and Morabito,A. (2003). Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: a new class of anticancer agents? *Lancet Oncol.* 4, 605-615.
- Geng,Y., Blanco,F.J., Cornelisson,M., and Lotz,M. (1995). Regulation of cyclooxygenase-2 expression in normal human articular chondrocytes. *J. Immunol.* 155, 796-801.
- Gherardi,E. and Stoker,M. (1990). Hepatocytes and scatter factor. *Nature* 346, 228.
- Ghosh,D.K., Abu-Soud,H.M., and Stuehr,D.J. (1995). Reconstitution of the second step in NO synthesis using the isolated oxygenase and reductase domains of macrophage NO synthase. *Biochemistry* 34, 11316-11320.
- Glockzin,S., von Knethen,A., Scheffner,M., and Brune,B. (1999). Activation of the cell death program by nitric oxide involves inhibition of the proteasome. *J Biol Chem* 274, 19581-19586.
- Greenbaum,L.E., Li,W., Cressman,D.E., Peng,Y., Ciliberto,G., Poli,V., and Taub,R. (1998). CCAAT enhancer- binding protein beta is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *J. Clin. Invest* 102, 996-1007.

- Griffith,O.W. and Stuehr,D.J. (1995). Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol* 57, 707-736.
- Grisham, J.W. (1962). A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer Res.* 22, 842-849.
- Haga,S., Terui,K., Zhang,H.Q., Enosawa,S., Ogawa,W., Inoue,H., Okuyama,T., Takeda,K., Akira,S., Ogino,T., Irani,K., and Ozaki,M. (2003). Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. *J. Clin. Invest* 112, 989-998.
- Heinrich,P.C., Behrmann,I., Haan,S., Hermanns,H.M., Muller-Newen,G., and Schaper,F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* 374, 1-20.
- Hendricks-Taylor,L.R. and Darlington,G.J. (1995). Inhibition of cell proliferation by C/EBP alpha occurs in many cell types, does not require the presence of p53 or Rb, and is not affected by large T-antigen. *Nucleic Acids Res.* 23, 4726-4733.
- Herschman,H.R. (1999). Function and regulation of prostaglandin synthase 2. *Adv. Exp. Med. Biol* 469, 3-8.
- Herschman,H.R., Gilbert,R.S., Xie,W., Luner,S., and Reddy,S.T. (1995). The regulation and role of TIS10 prostaglandin synthase-2. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* 23, 23-28.
- Hickey,M.J., Sharkey,K.A., Sihota,E.G., Reinhardt,P.H., Macmicking,J.D., Nathan,C., and Kubes,P. (1997). Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. *FASEB J.* 11, 955-964.

- Hierholzer,C., Harbrecht,B., Menezes,J.M., Kane,J., MacMicking,J., Nathan,C.F., Peitzman,A.B., Billiar,T.R., and Tweardy,D.J. (1998). Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. *J. Exp. Med.* 187, 917-928.
- Higgins, G. M and Anderson R.M. Experimental pathology of the liver: I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 12, 186. 1931.
- Hinz,B., Brune,K., and Pahl,A. (2000). Cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is modulated by cyclic AMP, prostaglandin E(2), and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 790-796.
- Hollenberg,S.M., Broussard,M., Osman,J., and Parrillo,J.E. (2000). Increased microvascular reactivity and improved mortality in septic mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Circ. Res.* 86, 774-778.
- Hollenberg,S.M., Easington,C.R., Osman,J., Broussard,M., and Parrillo,J.E. (1999). Effects of nitric oxide synthase inhibition on microvascular reactivity in septic mice. *Shock* 12, 262-267.
- Hortelano,S., Alvarez,A.M., and Bosca,L. (1999). Nitric oxide induces tyrosine nitration and release of cytochrome c preceding an increase of mitochondrial transmembrane potential in macrophages. *FASEB J.* 13, 2311-2317.
- Hortelano,S., Dewez,B., Genaro,A.M., Diaz-Guerra,M.J., and Bosca,L. (1995). Nitric oxide is released in regenerating liver after partial hepatectomy. *Hepatology* 21, 776-786.
- Houck,K.A. and Michalopoulos,G.K. (1989). Altered responses of regenerating hepatocytes to norepinephrine and transforming growth factor type beta. *J. Cell Physiol* 141, 503-509.

- Hu,K.Q. (2002). Rationale and feasibility of chemoprevention of hepatocellular carcinoma by cyclooxygenase-2 inhibitors. *J. Lab Clin. Med.* 139, 234-243.
- Huh,C.G., Factor,V.M., Sanchez,A., Uchida,K., Conner,E.A., and Thorgeirsson,S.S. (2004). Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 4477-4482.
- Igney,F.H. and Krammer,P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* 2, 277-288.
- Iimuro,Y., Nishiura,T., Hellerbrand,C., Behrns,K.E., Schoonhoven,R., Grisham ,J.W., and Brenner,D.A. (1998). NFkappaB prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *J. Clin. Invest* 101 , 802-811.
- Jones,D.E., Jr., Tran-Patterson,R., Cui,D.M., Davin,D., Estell,K.P., and Miller,D.M. (1995). Epidermal growth factor secreted from the salivary gland is necessary for liver regeneration. *Am. J. Physiol* 268, G872-G878.
- Kiemer,A.K., Hartung,T., Huber,C., and Vollmar,A.M. (2003). *Phyllanthus amarus* has anti-inflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF-kappaB pathway. *J. Hepatol.* 38, 289-297.
- Kim,Y.M., de Vera,M.E., Watkins,S.C., and Billiar,T.R. (1997a). Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J. Biol. Chem.* 272, 1402-1411.
- Kim,Y.M., Kim,T.H., Chung,H.T., Talanian,R.V., Yin,X.M., and Billiar,T.R. (2000). Nitric oxide prevents tumor necrosis factor alpha-induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of

mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosylation of caspase-8. *Hepatology* 32, 770-778.

Kim,Y.M., Talanian,R.V., and Billiar,T.R. (1997b). Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 272, 31138-31148.

Kimura,M., Osumi,S., and Ogihara,M. (2001). Prostaglandin E(2) (EP(1)) receptor agonist-induced DNA synthesis and proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes: the involvement of TGF-alpha. *Endocrinology* 142, 4428-4440.

Kischkel,F.C., Hellbardt,S., Behrmann,I., Germer,M., Pawlita,M., Krammer,P.H., and Peter,M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579-5588.

Knight,B., Yeoh,G.C., Husk,K.L., Ly,T., Abraham,L.J., Yu,C., Rhim,J.A., and Fausto,N. (2000). Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knockout mice. *J. Exp. Med.* 192, 1809-1818.

Knowles,R.G., Palacios,M., Palmer,R.M., and Moncada,S. (1989). Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 5159-5162.

Koga,H. (2003). Hepatocellular carcinoma: is there a potential for chemoprevention using cyclooxygenase-2 inhibitors? *Cancer* 98, 661-667.



- Kondo,M., Yamamoto,H., Nagano,H., Okami,J., Ito,Y., Shimizu,J., Eguchi,H., Miyamoto,A., Dono,K., Umeshita,K., Matsuura,N., Wakasa,K., Nakamori,S., Sakon,M., and Monden,M. (1999). Increased expression of COX-2 in nontumor liver tissue is associated with shorter disease-free survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 5, 4005-4012.
- Kopp,J.B., Factor,V.M., Mozes,M., Nagy,P., Sanderson,N., Bottinger,E.P., Klotman,P.E., and Thorgeirsson,S.S. (1996). Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta 1 develop progressive renal disease. *Lab Invest* 74, 991-1003.
- Kovalovich,K., Li,W., DeAngelis,R., Greenbaum,L.E., Ciliberto,G., and Taub,R. (2001). Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2, and Bcl-xL. *J. Biol. Chem.* 276, 26605-26613.
- Kraemer,S.A., Meade,E.A., and DeWitt,D.L. (1992). Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch Biochem. Biophys.* 293, 391-400.
- Kramer,A., Carstens,C.P., and Fahl,W.E. (1996). A novel CCAAT-binding protein necessary for adhesion-dependent cyclin A transcription at the G1/S boundary is sequestered by a retinoblastoma-like protein in G0. *J. Biol. Chem.* 271, 6579-6582.
- Krammer,P.H. (1999). CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv. Immunol.* 71, 163-210.
- Krawitt,E.L., Betel,I., and Potter,V.R. (1969). A study of the cytidine kinase pathway of nucleotide biosynthesis in regenerating rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 174, 763-765.

- Krueger,A., Baumann,S., Krammer,P.H., and Kirchhoff,S. (2001). FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 21, 8247-8254.
- Kumins,N.H., Hunt,J., Gamelli,R.L., and Filkins,J.P. (1997). Molsidomine increases endotoxic survival and decreases cytokine production. *Shock* 7, 200-205.
- Kurumbail,R.G., Stevens,A.M., Gierse,J.K., McDonald,J.J., Stegeman,R.A., Pak,J.Y., Gildehaus,D., Miyashiro,J.M., Penning,T.D., Seibert,K., Isakson,P.C., and Stallings,W.C. (1996). Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 384, 644-648.
- Lagasse,E., Connors,H., al Dhalimy,M., Reitsma,M., Dohse,M., Osborne,L., Wang,X., Finegold,M., Weissman,I.L., and Grompe,M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* 6, 1229-1234.
- Langenbach,R., Morham,S.G., Tiano,H.F., Loftin,C.D., Ghanayem,B.I., Chulada,P.C., Mahler,J.F., Lee,C.A., Goulding,E.H., Kluckman,K.D., and . (1995). Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell* 83, 483-492.
- Lara-Pezzi,E., Gomez-Gavero,M.V., Galvez,B.G., Mira,E., Iniguez,M.A., Fresno,M., Martinez,A., Arroyo,A.G., and Lopez-Cabrera,M. (2002). The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. *J. Clin. Invest* 110, 1831-1838.
- Leu,J.I., Crissey,M.A., Craig,L.E., and Taub,R. (2003a). Impaired hepatocyte DNA synthetic response posthepatectomy in insulin-like growth factor binding protein 1-deficient mice with defects in C/EBP

- beta and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase regulation. *Mol. Cell Biol.* 23, 1251-1259.
- Leu,J.I., Crissey,M.A., and Taub,R. (2003b). Massive hepatic apoptosis associated with TGF-beta1 activation after Fas ligand treatment of IGF binding protein-1-deficient mice. *J. Clin. Invest* 111, 129-139.
- Levy,D.E. and Lee,C.K. (2002). What does Stat3 do? *J. Clin. Invest* 109, 1143-1148.
- Li,W., Liang,X., Kellendonk,C., Poli,V., and Taub,R. (2002). STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration. *J. Biol. Chem.* 277, 28411-28417.
- Li,W., Liang,X., Leu,J.I., Kovalovich,K., Ciliberto,G., and Taub,R. (2001). Global changes in interleukin-6-dependent gene expression patterns in mouse livers after partial hepatectomy. *Hepatology* 33, 1377-1386.
- Lindroos,P.M., Zarnegar,R., and Michalopoulos,G.K. (1991). Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology* 13, 743-750.
- Liu,F., Song,Y., and Liu,D. (1999). Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* 6, 1258-1266.
- Loftin,C.D., Tiano,H.F., and Langenbach,R. (2002). Phenotypes of the COX-deficient mice indicate physiological and pathophysiological roles for COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69, 177-185.

- Lopez-Collazo,E., Mateo,J., Miras-Portugal,M.T., and Bosca,L. (1997). Requirement of nitric oxide and calcium mobilization for the induction of apoptosis in adrenal vascular endothelial cells. *FEBS Lett.* *413*, 124-128.
- Loranger,A., Duclos,S., Grenier,A., Price,J., Wilson-Heiner,M., Baribault,H., and Marceau,N. (1997). Simple epithelium keratins are required for maintenance of hepatocyte integrity. *Am. J. Pathol.* *151*, 1673-1683.
- Luong,C., Miller,A., Barnett,J., Chow,J., Ramesha,C., and Browner,M.F. (1996). Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat. Struct. Biol.* *3*, 927-933.
- Macias-Silva,M., Li,W., Leu,J.I., Crissey,M.A., and Taub,R. (2002). Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor-beta signals during liver regeneration. *J Biol Chem* *277*, 28483-28490.
- Maldve,R.E., Kim,Y., Muga,S.J., and Fischer,S.M. (2000). Prostaglandin E(2) regulation of cyclooxygenase expression in keratinocytes is mediated via cyclic nucleotide-linked prostaglandin receptors. *J. Lipid Res.* *41*, 873-881.
- Marletta,M.A. (1994). Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* *78*, 927-930.
- Martin-Sanz,P., Callejas,N.A., Casado,M., Diaz-Guerra,M.J., and Bosca,L. (1998). Expression of cyclooxygenase-2 in foetal rat hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide and pro-inflammatory cytokines. *Br. J. Pharmacol.* *125*, 1313-1319.
- Martin-Sanz,P., Diaz-Guerra,M.J., Casado,M., and Bosca,L. (1996). Bacterial lipopolysaccharide antagonizes transforming growth factor

- beta 1-induced apoptosis in primary cultures of hepatocytes. *Hepatology* 23, 1200-1207.
- Martinou,J.C. and Green,D.R. (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 63-67.
- Mastellos,D., Papadimitriou,J.C., Franchini,S., Tsonis,P.A., and Lambris,J.D. (2001). A novel role of complement: mice deficient in the fifth component of complement (C5) exhibit impaired liver regeneration. *J. Immunol.* 166, 2479-2486.
- Matsuo,T., Yamaguchi,S., Mitsui,S., Emi,A., Shimoda,F., and Okamura,H. (2003). Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science* 302, 255-259.
- Mayer,B. and Bohme,E. (1989). Ca<sup>2+</sup>-dependent formation of an L-arginine-derived activator of soluble guanylyl cyclase in bovine lung. *FEBS Lett.* 256, 211-214.
- McMillan,K. and Masters,B.S. (1995). Prokaryotic expression of the heme- and flavin-binding domains of rat neuronal nitric oxide synthase as distinct polypeptides: identification of the heme-binding proximal thiolate ligand as cysteine-415. *Biochemistry* 34, 3686-3693.
- Medema,J.P., Scaffidi,C., Kischkel,F.C., Shevchenko,A., Mann,M., Krammer,P.H., and Peter,M.E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 16, 2794-2804.
- Michalopoulos,G., Houck,K.A., Dolan,M.L., and Leutteke,N.C. (1984). Control of hepatocyte replication by two serum factors. *Cancer Res.* 44, 4414-4419.
- Michalopoulos,G.K. and DeFrances,M.C. (1997). Liver regeneration. *Science* 276, 60-66.

- Michalopoulos,G.K. and Khan,Z. (2005). Liver regeneration, growth factors, and amphiregulin. *Gastroenterology* 128, 503-506.
- Miller,A.D., Miller,D.G., Garcia,J.V., and Lynch,C.M. (1993). Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. *Methods Enzymol.* 217, 581-599.
- Minguet,S., Cortegano,I., Gonzalo,P., Martinez-Marin,J.A., de Andres,B., Salas,C., Melero,D., Gaspar,M.L., and Marcos,M.A. (2003). A population of c-Kit(low)(CD45/TER119)- hepatic cell progenitors of 11-day postcoitus mouse embryo liver reconstitutes cell-depleted liver organoids. *J. Clin. Invest* 112, 1152-1163.
- Mitchell,C., Nivison,M., Jackson,L.F., Fox,R., Lee,D.C., Campbell,J.S., and Fausto,N. (2005). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration. *J. Biol. Chem.* 280, 2562-2568.
- Mojena,M., Hortelano,S., Castrillo,A., Diaz-Guerra,M.J., Garcia-Barchino,M.J., Saez,G.T., and Bosca,L. (2001). Protection by nitric oxide against liver inflammatory injury in animals carrying a nitric oxide synthase-2 transgene. *FASEB J.* 15, 583-585.
- Morham,S.G., Langenbach,R., Loftin,C.D., Tiano,H.F., Vouloumanos,N., Jennette,J.C., Mahler,J.F., Kluckman,K.D., Ledford,A., Lee,C.A., and . (1995). Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 83, 473-482.
- Morio,L.A., Chiu,H., Sprowles,K.A., Zhou,P., Heck,D.E., Gordon,M.K., and Laskin,D.L. (2001). Distinct roles of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172, 44-51.
- Morita,I., Schindler,M., Regier,M.K., Otto,J.C., Hori,T., DeWitt,D.L., and Smith,W.L. (1995). Different intracellular locations for

prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 270, 10902-10908.

Murakami,M., Kambe,T., Shimbara,S., Higashino,K., Hanasaki,K., Arita,H., Horiguchi,M., Arita,M., Arai,H., Inoue,K., and Kudo,I. (1999). Different functional aspects of the group II subfamily (Types IIA and V) and type X secretory phospholipase A(2)s in regulating arachidonic acid release and prostaglandin generation. Implications of cyclooxygenase-2 induction and phospholipid scramblase-mediated cellular membrane perturbation. *J. Biol. Chem.* 274, 31435-31444.

Nanji,A.A., Miao,L., Thomas,P., Rahemtulla,A., Khwaja,S., Zhao,S., Peters,D., Tahan,S.R., and Dannenberg,A.J. (1997). Enhanced cyclooxygenase-2 gene expression in alcoholic liver disease in the rat. *Gastroenterology* 112, 943-951.

Navarro-Lerida,I., Portoles,M.T., Barrientos,A.A., Gavilanes,F., Bosca,L., and Rodriguez-Crespo,I. (2004). Induction of nitric oxide synthase-2 proceeds with the concomitant downregulation of the endogenous caveolin levels. *J. Cell Sci.* 117, 1687-1697.

Negishi,M., Sugimoto,Y., and Ichikawa,A. (1995). Molecular mechanisms of diverse actions of prostanoid receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1259, 109-119.

Nomura,Y., Uehara,T., and Nakazawa,M. (1996). Neuronal apoptosis by glial NO: involvement of inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Hum. Cell* 9, 205-214.

Obolenskaya,M., Schulze-Specking,A., Plaumann,B., Frenzer,K., Freudenberg,N., and Decker,K. (1994a). Nitric oxide production by cells isolated from regenerating rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 1305-1311.

- Obolenskaya,M.Y., Vanin,A.F., Mordvintcev,P.I., Mulsch,A., and Decker,K. (1994b). Epr evidence of nitric oxide production by the regenerating rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *202*, 571-576.
- Oe,S., Lemmer,E.R., Conner,E.A., Factor,V.M., Leveen,P., Larsson,J., Karlsson,S., and Thorgeirsson,S.S. (2004). Intact signaling by transforming growth factor beta is not required for termination of liver regeneration in mice. *Hepatology* *40*, 1098-1105.
- Ogasawara,J., Watanabe-Fukunaga,R., Adachi,M., Matsuzawa,A., Kasugai,T., Kitamura,Y., Itoh,N., Suda,T., and Nagata,S. (1993). Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* *364*, 806-809.
- Okahara,K., Sun,B., and Kambayashi,J. (1998). Upregulation of prostacyclin synthesis-related gene expression by shear stress in vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *18*, 1922-1926.
- Okano,J., Shiota,G., Matsumoto,K., Yasui,S., Kurimasa,A., Hisatome,I., Steinberg,P., and Murawaki,Y. (2003). Hepatocyte growth factor exerts a proliferative effect on oval cells through the PI3K/AKT signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res Commun.* *309*, 298-304.
- Olsen,P.S., Poulsen,S.S., and Kirkegaard,P. (1985). Adrenergic effects on secretion of epidermal growth factor from Brunner's glands. *Gut* *26*, 920-927.
- Overturf,K., al Dhalimy,M., Ou,C.N., Finegold,M., and Grompe,M. (1997). Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am. J. Pathol.* *151*, 1273-1280.
- Palacios,M., Knowles,R.G., Palmer,R.M., and Moncada,S. (1989). Nitric oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenal glands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *165*, 802-809.



- Pediaditakis,P., Lopez-Talavera,J.C., Petersen,B., Monga,S.P., and Michalopoulos,G.K. (2001). The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat. *Hepatology* 34, 688-693.
- Peters,M., Blinn,G., Jostock,T., Schirmacher,P., Meyer zum Buschenfelde,K.H., Galle,P.R., and Rose-John,S. (2000). Combined interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor accelerates murine liver regeneration. *Gastroenterology* 119, 1663-1671.
- Petersen,B., Yee,C.J., Bowen,W., Zarnegar,R., and Michalopoulos,G.K. (1994). Distinct morphological and mito-inhibitory effects induced by TGF-beta 1, HGF and EGF on mouse, rat and human hepatocytes. *Cell Biol. Toxicol.* 10, 219-230.
- Petersen,B.E., Bowen,W.C., Patrene,K.D., Mars,W.M., Sullivan,A.K., Murase,N., Boggs,S.S., Greenberger,J.S., and Goff,J.P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284, 1168-1170.
- Pfeilschifter,J., Rob,P., Mulsch,A., Fandrey,J., Vosbeck,K., and Busse,R. (1992). Interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha induce a macrophage-type of nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Eur. J. Biochem.* 203, 251-255.
- Pinkoski,M.J., Brunner,T., Green,D.R., and Lin,T. (2000). Fas and Fas ligand in gut and liver. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 278, G354-G366.
- Pitti,R.M., Marsters,S.A., Lawrence,D.A., Roy,M., Kischkel,F.C., Dowd,P., Huang,A., Donahue,C.J., Sherwood,S.W., Baldwin,D.T., Godowski,P.J., Wood,W.I., Gurney,A.L., Hillan,K.J., Cohen,R.L., Goddard,A.D., Botstein,D., and Ashkenazi,A. (1998). Genomic

- amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 396, 699-703.
- Qin,L.X. and Tang,Z.Y. (2002). The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 8, 385-392.
- Rabes,H.M., Wirsching,R., Tuzcek,H.V., and Iseler,G. (1976). Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy. *Cell Tissue Kinet.* 9, 517-532.
- Radomski,M.W., Palmer,R.M., and Moncada,S. (1990). An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 5193-5197.
- Rahman,M.A., Dhar,D.K., Yamaguchi,E., Maruyama,S., Sato,T., Hayashi,H., Ono,T., Yamanoi,A., Kohno,H., and Nagasue,N. (2001). Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of COX-2 in the angiogenesis of hepatitis C virus-positive cases. *Clin. Cancer Res.* 7, 1325-1332.
- Rai,R.M., Lee,F.Y., Rosen,A., Yang,S.Q., Lin,H.Z., Koteish,A., Liew,F.Y., Zaragoza,C., Lowenstein,C., and Diehl,A.M. (1998). Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthasedeficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 13829-13834.
- Rai,R.M., Yang,S.Q., McClain,C., Karp,C.L., Klein,A.S., and Diehl,A.M. (1996). Kupffer cell depletion by gadolinium chloride enhances liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Am. J. Physiol* 270, G909-G918.
- Rathmell,J.C. and Thompson,C.B. (1999). The central effectors of cell death in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 781-828.

- Ren,X., Hogaboam,C., Carpenter,A., and Colletti,L. (2003). Stem cell factor restores hepatocyte proliferation in IL-6 knockout mice following 70% hepatectomy. *J. Clin. Invest* 112, 1407-1418.
- Rengasamy,A. and Johns,R.A. (1993). Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide. *Mol. Pharmacol.* 44, 124-128.
- Richards,M.K. and Marletta,M.A. (1994). Characterization of neuronal nitric oxide synthase and a C415H mutant, purified from a baculovirus overexpression system. *Biochemistry* 33, 14723-14732.
- Rosenfeld,M.E., Prichard,L., Shiojiri,N., and Fausto,N. (2000). Prevention of hepatic apoptosis and embryonic lethality in RelA/TNFR-1 double knockout mice. *Am. J. Pathol* 156, 997-1007.
- Rudnick,D.A., Perlmutter,D.H., and Muglia,L.J. (2001). Prostaglandins are required for CREB activation and cellular proliferation during liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 8885-8890.
- Russell,W.E., Kaufmann,W.K., Sitaric,S., Luetkeke,N.C., and Lee,D.C. (1996). Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor-alpha-targeted mice. *Mol. Carcinog.* 15, 183-189.
- Sakamoto,T., Liu,Z., Murase,N., Ezure,T., Yokomuro,S., Poli,V., and Demetris,A.J. (1999). Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* 29, 403-411.
- Sanderson,N., Factor,V., Nagy,P., Kopp,J., Kondaiah,P., Wakefield,L., Roberts,A.B., Sporn,M.B., and Thorgeirsson,S.S. (1995). Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 2572-2576.

- Sandgren,E.P., Palmiter,R.D., Heckel,J.L., Daugherty,C.C., Brinster,R.L., and Degen,J.L. (1991). Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell* 66 , 245-256.
- Sass,G., Koerber,K., Bang,R., Guehring,H., and Tiegs,G. (2001). Inducible nitric oxide synthase is critical for immune-mediated liver injury in mice. *J. Clin. Invest* 107, 439-447.
- Scaffidi,C., Fulda,S., Srinivasan,A., Friesen,C., Li,F., Tomaselli,K.J., Debatin,K.M., Krammer,P.H., and Peter,M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17, 1675-1687.
- Schmidt,C., Bladt,F., Goedecke,S., Brinkmann,V., Zschiesche,W., Sharpe,M., Gherardi,E., and Birchmeier,C. (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373, 699-702.
- Schmitz,I., Kirchhoff,S., and Krammer,P.H. (2000). Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 32, 1123-1136.
- Schwartzman,R.A. and Cidlowski,J.A. (1993). Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr. Rev.* 14, 133-151.
- Shimizu,M., Hara,A., Okuno,M., Matsuno,H., Okada,K., Ueshima,S., Matsuo,O., Niwa,M., Akita,K., Yamada,Y., Yoshimi,N., Uematsu,T., Kojima,S., Friedman,S.L., Moriwaki,H., and Mori,H. (2001). Mechanism of retarded liver regeneration in plasminogen activator-deficient mice: impaired activation of hepatocyte growth factor after Fas-mediated massive hepatic apoptosis. *Hepatology* 33, 569-576.

- Shimohashi,N., Nakamuta,M., Uchimura,K., Sugimoto,R., Iwamoto,H., Enjoji,M., and Nawata,H. (2000). Selenoorganic compound, ebselen, inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production by the modulation of jun-N-terminal kinase and the NF-kappaB signaling pathway in rat Kupffer cells. *J. Cell Biochem* 78, 595-606.
- Siendones,E., Fouad,D., Diaz-Guerra,M.J., de la,M.M., Bosca,L., and Muntane,J. (2004). PGE1-induced NO reduces apoptosis by D-galactosamine through attenuation of NF-kappaB and NOS-2 expression in rat hepatocytes. *Hepatology* 40, 1295-1303.
- Sigal,S.H., Rajvanshi,P., Gorla,G.R., Sokhi,R.P., Saxena,R., Gebhard,D.R., Jr., Reid,L.M., and Gupta,S. (1999). Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *Am. J. Physiol* 276, G1260-G1272.
- Smith,W.L. and DeWitt,D.L. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv. Immunol.* 62, 167-215.
- Smith,W.L., DeWitt,D.L., and Garavito,R.M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 145-182.
- Stolz,D.B. and Michalopoulos,G.K. (1997). Synergistic enhancement of EGF, but not HGF, stimulated hepatocyte motility by TGF-beta 1 in vitro. *J. Cell Physiol* 170, 57-68.
- Straus,D.S., Pascual,G., Li,M., Welch,J.S., Ricote,M., Hsiang,C.H., Sengchanthalangsy,L.L., Ghosh,G., and Glass,C.K. (2000). 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 4844-4849.
- Strey,C.W., Markiewski,M., Mastellos,D., Tudoran,R., Spruce,L.A., Greenbaum,L.E., and Lambris,J.D. (2003). The proinflammatory

- mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J. Exp. Med.* *198*, 913-923.
- Stuehr,D.J. and Marletta,M.A. (1985). Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *82*, 7738-7742.
- Stuehr,D.J. and Marletta,M.A. (1987a). Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon-gamma. *J. Immunol.* *139*, 518-525.
- Stuehr,D.J. and Marletta,M.A. (1987b). Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. *Cancer Res.* *47*, 5590-5594.
- Su,B. and Karin,M. (1996). Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr. Opin. Immunol.* *8*, 402-411.
- Takabe,K., Wang,L., Leal,A.M., Macconell,L.A., Wiater,E., Tomiya,T., Ohno,A., Verma,I.M., and Vale,W. (2003). Adenovirus-mediated overexpression of follistatin enlarges intact liver of adult rats. *Hepatology* *38*, 1107-1115.
- Takamura,T., Kato,I., Kimura,N., Nakazawa,T., Yonekura,H., Takasawa,S., and Okamoto,H. (1998). Transgenic mice overexpressing type 2 nitric-oxide synthase in pancreatic beta cells develop insulin-dependent diabetes without insulinitis. *J Biol Chem* *273*, 2493-2496.
- Talarmin,H., Rescan,C., Cariou,S., Glaise,D., Zanninelli,G., Bilodeau,M., Loyer,P., Guguen-Guillouzo,C., and Baffet,G. (1999). The mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating hepatocytes. *Mol. Cell Biol.* *19*, 6003-6011.

- Taub,R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 836-847.
- Tay,A., Squire,J.A., Goldberg,H., and Skorecki,K. (1994). Assignment of the human prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) gene to 1q25 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 23, 718-719.
- Thippeswamy,T. and Morris,R. (1997). Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate-mediated neuroprotection by nitric oxide in dissociated cultures of rat dorsal root ganglion neurones. *Brain Res* 774, 116-122.
- Tiegs,G., Hentschel,J., and Wendel,A. (1992). A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J. Clin. Invest* 90, 196-203.
- Tomiya,T. and Fujiwara,K. (1993). Serum levels of transforming growth factor-alpha in patients after partial hepatectomy as determined with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Hepatology* 18, 304-308.
- Tomiya,T., Hayashi,S., Yanase,M., Umeda,N., Tani,M., Yamada,S., Masaki,N., Ogata,I., and Fujiwara,K. (1997). Serum transforming growth factor-alpha level can be a parameter for evaluating liver regeneration after partial hepatectomy in patients with liver cancer. *Semin. Oncol.* 24, S6.
- Tomiya,T., Ogata,I., Yamaoka,M., Yanase,M., Inoue,Y., and Fujiwara,K. (2000). The mitogenic activity of hepatocyte growth factor on rat hepatocytes is dependent upon endogenous transforming growth factor-alpha. *Am. J Pathol.* 157, 1693-1701.
- Tomiya,T., Tani,M., Yamada,S., Hayashi,S., Umeda,N., and Fujiwara,K. (1992). Serum hepatocyte growth factor levels in hepatectomized and nonhepatectomized surgical patients. *Gastroenterology* 103, 1621-1624.

- Tsubouchi,H., Niitani,Y., Hirono,S., Nakayama,H., Gohda,E., Arakaki,N., Sakiyama,O., Takahashi,K., Kimoto,M., Kawakami,S., and . (1991). Levels of the human hepatocyte growth factor in serum of patients with various liver diseases determined by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Hepatology* 13, 1-5.
- Tzeng,E., Billiar,T.R., Williams,D.L., Li,J., Lizonova,A., Kovesdi,I., and Kim,Y.M. (1998). Adenovirus-mediated inducible nitric oxide synthase gene transfer inhibits hepatocyte apoptosis. *Surgery* 124, 278-283.
- Vassilopoulos,G., Wang,P.R., and Russell,D.W. (2003). Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 422, 901-904.
- Verhagen,A.M., Ekert,P.G., Pakusch,M., Silke,J., Connolly,L.M., Reid,G.E., Moritz,R.L., Simpson,R.J., and Vaux,D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43-53.
- Vos,T.A., Gouw,A.S., Klok,P.A., Havinga,R., van Goor,H., Huitema,S., Roelofsen,H., Kuipers,F., Jansen,P.L., and Moshage,H. (1997). Differential effects of nitric oxide synthase inhibitors on endotoxin-induced liver damage in rats. *Gastroenterology* 113, 1323-1333.
- Wallenius,V., Wallenius,K., and Jansson,J.O. (2000). Normal pharmacologically-induced, but decreased regenerative liver growth in interleukin-6-deficient (IL-6(-/-)) mice. *J. Hepatol.* 33, 967-974.
- Webber,E.M., Bruix,J., Pierce,R.H., and Fausto,N. (1998). Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology* 28, 1226-1234.



- Webber,E.M., FitzGerald,M.J., Brown,P.I., Bartlett,M.H., and Fausto,N. (1993). Transforming growth factor-alpha expression during liver regeneration after partial hepatectomy and toxic injury, and potential interactions between transforming growth factor-alpha and hepatocyte growth factor. *Hepatology* 18, 1422-1431.
- Webber,E.M., Godowski,P.J., and Fausto,N. (1994). In vivo response of hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus. *Hepatology* 19, 489-497.
- Westwick,J.K., Weitzel,C., Leffert,H.L., and Brenner,D.A. (1995). Activation of Jun kinase is an early event in hepatic regeneration. *J. Clin. Invest* 95, 803-810.
- Williams,C.S. and DuBois,R.N. (1996). Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am. J. Physiol.* 270, G393-G400.
- Willoughby,D.A., Moore,A.R., and Colville-Nash,P.R. (2000). Cyclopentenone prostaglandins-new allies in the war on inflammation. *Nat. Med.* 6, 137-138.
- Wustefeld,T., Rakemann,T., Kubicka,S., Manns,M.P., and Trautwein,C. (2000). Hyperstimulation with interleukin 6 inhibits cell cycle progression after hepatectomy in mice. *Hepatology* 32, 514-522.
- Xie,Q.W., Cho,H.J., Calaycay,J., Mumford,R.A., Swiderek,K.M., Lee,T.D., Ding,A., Troso,T., and Nathan,C. (1992). Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256, 225-228.
- Xie,Q.W., Whisnant,R., and Nathan,C. (1993). Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 177, 1779-1784.

- Xie,W.L., Chipman,J.G., Robertson,D.L., Erikson,R.L., and Simmons,D.L. (1991). Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 2692-2696.
- Yamada,Y., Kirillova,I., Peschon,J.J., and Fausto,N. (1997). Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 1441-1446.
- Yamada,Y., Webber,E.M., Kirillova,I., Peschon,J.J., and Fausto,N. (1998). Analysis of liver regeneration in mice lacking type 1 or type 2 tumor necrosis factor receptor: requirement for type 1 but not type 2 receptor. *Hepatology* 28, 959-970.
- Yanagi,S. and Potter,V.R. (1977). Sequential changes in ornithine decarboxylase thymidine kinase, and other enzyme activities in regenerating liver in rats on controlled feeding schedules. *Life Sci.* 20, 1509-1519.
- Zamzami,N. and Kroemer,G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 67-71.
- Zhang,F., Warskulat,U., Wettstein,M., Schreiber,R., Henninger,H.P., Decker,K., and Haussinger,D. (1995). Hyperosmolarity stimulates prostaglandin synthesis and cyclooxygenase-2 expression in activated rat liver macrophages. *Biochem. J.* 312 ( Pt 1), 135-143.