

Universitat de Barcelona

Facultat de Medicina

**Mecanismes de senyalització  
intracel·lulars en  
isquèmia/reperfusió hepàtica**

Laura Llacuna Duran

Barcelona 2009



Programa de doctorat de Biologia i Patologia Cel·lular  
Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica  
Facultat de Medicina

## **Universitat de Barcelona**

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Albert Morales Muñoz i el Dr. José Carlos Fernández-Checa Torres en el Departament de Mort i Proliferació Cel·lular de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, Consell Superior d'Investigacions Científiques i a la Unitat de Fetge de l'Institut de Malalties Digestives, Hospital Clínic i Provincial, Institut d'Investigacions Biomèdiques August i Pi Sunyer (IDIBAPS).



*“La possibilitat de realitzar un somni,  
és el que fa que la vida sigui interessant”*

*Paulo Coelho*



**Als meus pares, Toni i Carme,**

**A la meva iaia Pili i al Pol**





Potser aquest és el punt més difícil d'escriure, em sembla que després de tots aquests anys és molta la gent que m'ha aguantat i a qui li he d'agrair el seu suport i ajut, espero no deixar-me a ningú.

A l'Albert, per haver-me donat l'oportunitat d'introduir-me en el fascinant, i moltes vegades difícil, món científic. Per haver depositant la seva confiança en mi i per haver-me guiat i recolzat durant aquests anys de doctorat, gràcies.

Al Carlos i la Carmen, per estar al capdavant, pels bons consells i per fer possible que aquesta tesi hagi seguit endavant.

A la Montse, per haver-me ensenyat i per haver-me donat un cop de mà en molts moments, gràcies.

A la Susana, per ajudar-me a fer les primeres isquèmies, per haver-me aguantat durant tots aquests anys, per haver compartit amb mi bons i no tant bons moments en el laboratori, i per estar sempre disposada al que faci falta, gràcies.

A la Raquel, per compartir els meus primers passos en el laboratori i per haver-me fet sentir com a casa.

Al Joan, per la confiança, per haver tingut paciència amb mi i per haver-me fet costat sobretot en els últims tràmits de la tesi.

A l'Anna Moles, per haver estat al meu costat durant tota aquesta trajectòria, per haver compartit amb mi molts altibaixos, per escoltar-me, per ajudar-me sempre que ho he necessitat, per tots els moments que hem passat juntes, pel recolzament i sobretot pels moments espontanis i els atacs de riure.

A l'Anna Fernández i al Fran pel recolzament, per haver format part de molts moments en el laboratori i per algunes escapadetes de cap de setmana.

A l'Alberto, por no querer escucharme cuando lo único que hacia era "llorar", por la complicidad, por las mejores risas y por convertir-te en un buen amigo, gracias.

A la resta dels meus companys de laboratori, l'Anna Colell, el Lluís, la Núria Tarrats, la Helen, la Raquel Fucho, la Núria Matías i la Claudia per haver-me ensenyat o simplement per haver estat amb mi.

A la Irene, el Jordi, la Míriam, l'Erola i l'Olga, per compartir les bones estones dels dinars, per les poques però inoblidables festes i per ser del gremi.

A les meves amigues de l'ànima, la Mary i la Núria, gràcies per escoltar-me, per animar-me, per estar al meu costat, per ajudar-me sempre, per estimar-me, per anar sempre amb mi i per fer-me de germanes.

A la Nuri, la meva veïna preferida, per ser una bona amiga, per recordar-se sempre de mi i per mimar-me.

A l'Esther, la meva amiga des de la uni, pels bons moments titi, per cuidar-me, per animar-me i per recolzar-me sempre.

Al grup de sweetcatalunya, i molt especialment al pack de Girona que són infalibles a l'hora de fer-me riure.

A l'Edu i la Núria, al Jordi i al Koko per preocupar-se i preguntar pels meus ratolins, pels soparets a casa i per fer equip!!!!

Al Bernat, pels dinars i perquè encara que no ens veiem molt sovint sempre sé que estàs allà i sobretot pel petitet però molt important granet de sorra que vas aportar.

A la Sílvia, per compartir signe i entendre'm en molts aspectes, pels cafetons, per haver-me portat aquell dia a ballar salsa i per ser una amiga fidel.

A la Cristina i al Migui, per haver estat al meu costat en moments difícils i per haver compartit moltíssims moments bons, gràcies.

A l'Aneta Mas, per les bones i càlides estones, per la platgeta, pels bailoteos, pels estius, per escoltar-me i ajudar-me, per poder comptar amb tu, gràcies.

A l'Helena, per fer-me créixer, per ensenyar-me i per fer-me tocar de peus a terra.

A la meva cosineta, la Xexi, per fer-me veure les coses des d'un altre punt de vista, pels bons moments, per riure sempre amb les meves bromes, pel "macarrón" i per formar part de mi, gràcies.

A la meva tieta, per pensar en mi, per compartir una mica la vena científica i també l'artística, per ensenyar-me a jugar a tennis, per ser una bona tieta i pels moments de carinyo.

A la meva àvia, per ser el meu punt de referència, per preocupar-se sempre per mi, per escoltar-me, per aconsellar-me, per tenir paciència i...pels tppers.

Als meus pares, que m'ho han donat tot i sense ells no hagués arribat mai un dia com avui. Gràcies pels bons moments i els no tant bons, per haver-me recolzat, per haver aguantat els meus "prontos", per haver-me ensenyat a estimar i a ser bona persona i per ser tant especials, gràcies.

I com no, al Pol, per estar al meu costat en tot moment, per animar-me, per ser un exemple de motivació, de força i d'energia positiva, per donar-me pau i per ajudar-me a no donar més importància a les coses que no valen la pena i fer-me valorar les petites i més senzilles coses de la vida que et fan sentir feliç, per fer que vulgui ser millor persona cada dia, per saber treure'm un somriure quan ningú altre ho aconseguiria, per aguantar-me, per entendre'm, per mimar-me, per estimar-me, gràcies.

Moltes gràcies a tothom!!!



## **ÍNDEX**



---

<b><u>ABREVIATURES</u></b>	1
<b><u>INTRODUCCIÓ</u></b>	7
<b>1.El fetge. Estructura i funcionalitat bàsica</b>	9
<b>2. Isquèmia/Reperfusió</b>	13
2.1. Anatomia i rellevància clínica	13
2.2. Progressió del dany hepàtic produït per I/R	14
2.3. Mecanismes cel·lulars del dany hepàtic produït per I/R	17
2.3.1. Paradoxa del pH	17
2.3.2. MPT	17
2.3.3. Estrès oxidatiu i ROS	17
2.3.4. Cèl·lules de Kupffer	18
2.3.5. Limfòcits T	19
2.3.6. Citocines i Quimioquines	20
2.3.7. Microcirculació	21
2.4. Senyalització intracel·lular durant I/R	22
2.4.1. NF- $\kappa$ B	23
2.4.2. JNK	27
2.4.3. AKT	28
<b>3. Els Esfingolípid</b>	29
3.1. Estructura molecular	29
3.2. Metabolisme esfingolipídic	30
3.3. Funcions biològiques	33
3.3.1. Regulació de la mort cel·lular per esfingolípid	33
3.3.2. Regulació de vies de supervivència	34
3.4. Els esfingolípid en la Isquèmia/Reperfusió	37
<b>4. El Glutatió</b>	38
4.1. Síntesi del glutatió	38
4.2. Via de la transulfuració	40
4.3. Funcions del glutatió	41
4.4. Glutatió mitocondrial	43
4.4.1. Funcions del glutatió mitocondrial	43
4.5. El glutatió en la Isquèmia/Reperfusió	44
<b>5. Formes de mort cel·lular</b>	46
5.1. Necrosi	46
5.2. Apoptosi	46
5.2.1. Via extrínseca	47
5.2.2. Via intrínseca	48
5.3 Permeabilitat mitocondrial	49
5.3.1 Permeabilitat mitocondrial transitòria	49
5.3.2 Permeabilitat per proteïnes de la família Bcl-2	50

---

5.4. La mort cel·lular en la isquèmia/reperfusió	51
<b>6. Estratègies de protecció front I/R</b>	<b>54</b>
<b><u>OBJECTIUS</u></b>	<b>57</b>
<b><u>MATERIALS I MÈTODES</u></b>	<b>61</b>
<b>1. Isquèmia parcial hepàtica</b>	<b>63</b>
<b>2. Administració de fàrmacs</b>	<b>64</b>
<b>3. Mesura dels nivells de TNF en plasma</b>	<b>64</b>
<b>4. Determinació de transaminases</b>	<b>64</b>
<b>5. Cultius cel·lulars</b>	<b>65</b>
5.1 Línies cel·lulars	65
5.2 Aïllament d'hepatòcits i cèl·lules de Kupffer	65
5.3 Cultiu primari d'hepatòcits de ratolí	67
5.4 Aïllament i cultiu de cèl·lules de Kupffer	68
5.5 Tractaments cel·lulars	69
<b>6. Transfecció <i>in vitro</i> i tractament <i>in vivo</i> d'ARNi</b>	<b>69</b>
<b>7. Obtenció d'homogenats de fetge</b>	<b>71</b>
<b>8. Obtenció d'extractes nuclears</b>	<b>72</b>
<b>9. Valoració de proteïnes</b>	<b>73</b>
<b>10. Determinació de proteïnes</b>	<b>74</b>
10.1 Electroforesi en gel d' SDS-poliacrilamida	74
10.2 Western-Blot	76
10.3 Immunoprecipitació	78
10.4 Eliminació d'anticossos de la membrana "stripping"	79
<b>11. Determinació de caspasa 3</b>	<b>80</b>
<b>12. Determinació de l'activitat esfingomielinasa</b>	<b>81</b>
12.1 Esfingomielinasa neutra	81
12.2 Esfingomielinasa àcida	82



---

<b>13. Determinació de l'activitat ceramidasa</b>	82
13.1 Ceramidasa neutra	82
13.2 Ceramidasa àcida	83
<b>14. Determinació de l'activitat glucosil ceramida sintasa</b>	83
<b>15. Determinació de la ceramida endògena</b>	84
<b>16. Determinació de gangliòsids</b>	87
<b>17. Assaig TUNEL i Immunohistoquímica</b>	88
<b>18. Tincions hematoxilina/eosina</b>	88
<b>19. MDA. Mesura de la peroxidació lipídica</b>	90
<b>20. Assaig Mieloperoxidasa</b>	91
<b>21. Detecció d'espècies reactives d'oxigen (ROS)</b>	92
<b>22. GSH i GSSG per HPLC</b>	92
<b>23. Mesura del glutatió total per espectrofotometria</b>	94
<b>24. Extracció i anàlisi d'ARN</b>	95
24.1 Extracció	95
24.2 RT-PCR	96
24.3 RT-PCR quantitativa a temps real	97
<b><u>RESULTATS</u></b>	99
♦ <b><u>PRIMER ESTUDI</u></b>	101
1. Acumulació transitòria de ceramida per activació seqüencial de l'esfingomielinasa àcida i la ceramidasa àcida durant la I/R	101
2. La regulació farmacològica de la ceramida, modula el dany hepàtic induït per I/R	104
3. El silenciament de l'esfingomielinasa àcida amb ARNi protegeix al fetge contra el dany induït per I/R	107
4. La regulació de la ceramida durant la I/R modula la via mitocondrial de mort cel·lular	110

---

5. L'activació de JNK per I/R és suprimida per la inhibició de l'esfingomielinasa àcida	113
6. La regulació de la ceramida modula la supervivència després de la I/R total hepàtica	115
♦ <u>SEGON ESTUDI</u>	117
7. Estrès oxidatiu i secreció de TNF durant I/R	117
8. Expressió de gens proinflamatoris i antiapoptòtics κB depenents durant la I/R	119
9. La inactivació de les cèl·lules de Kupffer disminueix la producció de TNF/IL-1β durant la I/R	122
10. La teràpia amb SAM incrementa selectivament els nivells de GSH emmagatzemat en les cèl·lules parenquimals protegint front el dany hepàtic mediat per I/R	124
11. Efectes diferencials de SAM i BSO en l'expressió de TNF/IL-1β i MnSOD/CIAP-2 durant la I/R	129
<u>DISCUSSIÓ</u>	131
<u>CONCLUSIONS</u>	143
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	147
<u>ANNEX</u>	167

## **ABREVIATURES**



## **ABREVIATURES**

- ACDasa** ceramidasa àcida
- ADN** àcid desoxiribonucleic
- ADP** adenosina difosfat
- AIF** *apoptosis induction factor*, factor inductor d'apoptosi
- ANT** transportador de nucleòtids d'adenosina
- AP-1** *activated protein 1*, proteïna activadora 1
- Apaf-1** factor activador d'apoptosi
- ARN** àcid ribonucleic
- ARNi** àcid ribonucleic d'interferència
- ARNm** àcid ribonucleic missatge
- ASK** *apoptosis signaling kinase*, cinasa senyalitzadora d'apoptosi
- ASMa** *acid sphingomyelinase*, esfingomielinasa àcida
- AT** aminotransferases
- ALT** alanina aminotransferases
- AST** aspartat aminotransferases
- ATP** adenosina trifosfat
- BH** dominis homòlegs de Bcl-2
- BSA** albúmina sèrica bovina
- BSO** *buthionine sulfoximine*, butionina sulfoximina
- CBS** cistationina  $\beta$  sintasa
- CDasa** ceramidasa
- CsA** ciclosporina A
- CS** ceramida sintasa
- CINC** *cytokine-induced neutrophil chemoattractant*, quimioattractants de neutròfils induït per citocines
- DAG** diacilglicerol
- DCF** 2',7'-Diclorofluoresceïna
- DGK** diacilglicerol cinasa
- DISC** *death-inducing signalling complex*, complex senyalitzador de inducció de mort
- DTT** ditiotreitol
- EC** *endothelial cells*, cèl·lules endotelials
- eNOS** *endothelial nitric oxide synthase*, isoforma endotelial de la òxid nítric sintasa

**ET-1** endotelina-1

**FADD** *Fas associades death domain*, domini de mort associat a Fas

**FADH<sub>2</sub>** dinucleòtid de flavina-adenina reduït

**f.a.f** *fatty acid free*, lliure d'àcids grassos

**FasL** lligand del receptor Fas

**Fas** receptor Fas (CD95/Apo-1)

**GCE**  $\gamma$ -glutamilcistein etil éster

**GCL** lligasa glutamat-cisteïna

**GCS** glucosil ceramida sintasa

**$\gamma$ -GCS**  $\gamma$ -glutamil cisteïna sintasa

**GD3** gangliòsido GD3

**GlcCer** glucosilceramida

**GSLs** glicoesfingolípid

**GM3** gangliòsid GM3

**GS** glutatió sintasa

**GSH** glutatió reduït

**GSH-Px** glutatió peroxidasa

**GSK- $\beta$**  glicogen sintasa cinasa  $\beta$

**GSSG** glutatió oxidat

**GST** glutatió S-transferasa

**GR** glutatió reductasa

**HDL** *heavy density lipoprotein*, lipoproteïna d'alta densitat

**HMGCoA reductasa** hidroximetilglutaril CoA-reductasa

**HPLC** *high performance liquid chromatography*, cromatografia líquida d'alta resolució

**HPTLC** *high performance thin layer chromatography*, cromatografia de capa fina d'alta resolució

**IAA** àcid iodoacètic

**IAP** proteïna inhibidora d'apoptosi

**ICAM** molècula d'adhesió intercel·lular

**IFN- $\gamma$**  interferó- $\gamma$

**I $\kappa$ B** proteïna inhibidora de NF- $\kappa$ B

**IKK** cinasa de I $\kappa$ B

**IL** interleucina

**iNOS** *inducible nitric oxide synthase*, isoforma induïble de la òxid nítric sintasa

**I/R** isquèmia/reperfusió

- JNK** *c-jun N-terminal kinase*, cinasa N-terminal c-jun
- KC** *kupffer cells*, cèl·lules de kupffer
- LDL** *low density lipoprotein* lipoproteïna de baixa densitat
- MAT** metionina adenosil tranferasa
- MAP** *mitogen-activated proteins*, proteïnes activades per mitogen
- MCP** *monocyte chemoattractant proteins*, proteïnes quimioattractants de monòcits
- mGSH** glutatió reduït mitocondrial
- MHC** *major histocompatibility complex*, complex major de histocompatibilitat
- MIP** *macrophage inflammatory protein*, proteïnes inflammatòries de macròfags
- MKK** cinasa de les MAP cinasa
- MME** membrana mitocondrial externa
- MMI** membrana mitocondrial interna
- MnSOD** Manganès superòxid dismutasa
- MnTBAP** *Manganese tetrakis (4-Benzoic acid) porphyrine Chloride*, mimètic de la manganès superòxid dismutasa.
- MP** membrana plasmàtica
- MPO** mieloperoxidasa
- MPT** permeabilitat mitocondrial transitòria
- NAC** N-acetil cisteïna
- NAD** dinucleòtid de nicotiamida adenina oxidat
- NADH** dinucleòtid de nicotinamida adenina reduït
- NADPH** dinucleòtid fosfat de nicotinamida adenina
- NBD** N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-amino
- NEMO** *NF-κB essential modulator*, modulador essencial d'NF-κB
- NF-κB** factor nuclear κB
- NO** *nitric oxide*, òxid nítric
- NSMasa** *neutral Sphingomyelinase*, esfingomielinasa neutra
- O<sup>•</sup>** radical superòxid
- OH<sup>•</sup>** radical hidroxil
- PAF** *platelet-activating factor*, factor activador de les plaquetes
- PBS** tampó fosfat salí
- PCR** reacció en cadena de la polimerasa
- PGs** prostaglandines
- Pi** anió fosfat
- PI3** fosfatidilinositol-3-fosfat

**PMN** cèl·lules polimorfonuclears

**PTX** pentoxifilina

**RAIDD** *receptor associated interleukine death domain*, domini de mort associat al receptor d'interleucines

**RE** reticle endoplasmàtic

**RIP** *receptor interacting protein 1*, proteïna 1 interaccionadora amb el receptor

**RNS** *reactive nitrogen species*, espècies reactives de nitrogen

**ROS** *reactive oxygen species*, espècies reactives d'oxigen

**RT-PCR** transcripció reversa de la reacció en cadena de la polimerasa

**SDS-PAGE** electroforesi en gels de poliacrilamida-dodecilsulfat de sodi

**S1P** esfingosina 1-fosfat

**S1PR** receptor d'esfingosina 1-fosfat

**SAM** S-adenosil metionina

**SH** grup sulfhidril

**SK** esfingosina cinasa

**SM** esfingomielina

**SMasa** esfingomielinasa

**SMS** esfingomielina sintasa

**SPT** serin palmitoil transferasa

**TBA** tiobarbitúric

**TBS** tampó salí amb Tris

**TLC** *thin layer chromatography*, cromatografia de capa fina

**TLR4** receptor *toll like 4*

**TNF** *tumor necrosis factor*, factor de necrosi tumoral

**TNFR** *tumor necrosis factor receptor*, receptor del factor de necrosi tumoral

**TRADD** *TNF receptor associated death domain*, domini de mort associat al receptor de TNF

**TRAF** *TNF receptor associated factor*, factor associat al receptor de TNF

**TRAIL** *TNF-related apoptosis inducing ligand*, lligand inductor d'apoptosi associat al TNF

**TRAIL-R** *TNF-related apoptosis inducing ligand receptor*, receptor del lligand inductor d'apoptosi associat al TNF

**TUNEL** marcatge d'uridines terminals per la uridina deoxinucleotidil transferasa

**UV** ultravioleta

**VDAC** *voltage dependent anion carrier*, canal aniònic dependent de voltatge

**VLDL** *very low density lipoprotein*, lipoproteïna de molt baixa densitat



# **INTRODUCCIÓ**



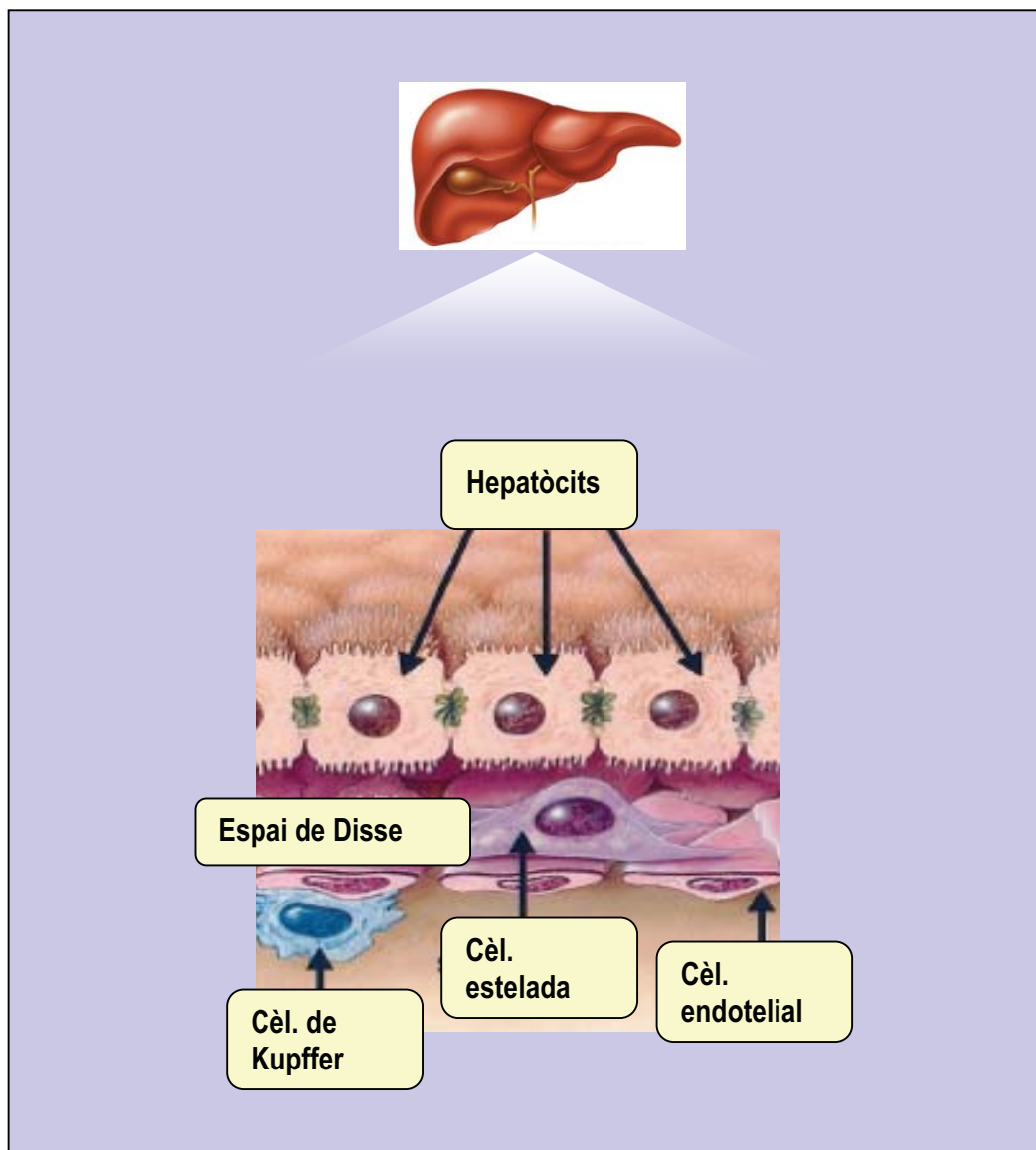
## **1. EL FETGE. ESTRUCTURA I FUNCIONALITAT BÀSICA**

El fetge és un òrgan de vital importància per a la supervivència de l'organisme. És molt versàtil i realitza múltiples i molt variades funcions. Es troba implicat en el metabolisme de carbohidrats, proteïnes i lípids, i també realitza funcions detoxificants (de toxines i fàrmacs) i immunològiques, entre d'altres.

El fetge es troba situat a la cavitat abdominal i es desenvolupa com una evaginació de l'intestí prim [1]. Al igual que succeeix amb altres òrgans, és format per diferents tipus de cèl·lules que interaccionen entre si i amb la matriu extracel·lular. És aquesta interacció la que permet mantenir l'estructura hepàtica normal i el funcionament harmònic de les cèl·lules. Els principals tipus cel·lulars residents al fetge són 4 [figura 1]:

- hepatòcits
- cèl·lules de Kupffer
- cèl·lules estelades
- cèl·lules endotelials

Les cèl·lules majoritàries del fetge són els hepatòcits. Aquestes estan disposades en fileres radials orientades cap a uns espais plens de sang anomenats sinusoides. Segons la seva localització dins del lobulec hepàtic manifesten diferents propietats estructurals, histoquímiques i bioquímiques. La sang està separada de la superfície dels hepatòcits per una capa de cèl·lules endotelials aplanades separades entre elles per uns petits orificis. Aquestes presenten receptors per a l'endocitosis de substàncies com LDL i també produeixen mediadors vasoactius (endotelina-1) i citocines. Entre aquests dos tipus cel·lulars es troba situat l'anomenat espai de *Disse*. Gràcies als petits orificis de la capa endotelial és possible l'intercanvi de molècules entre l'espai de *Disse* i el torrent circulatori [2].



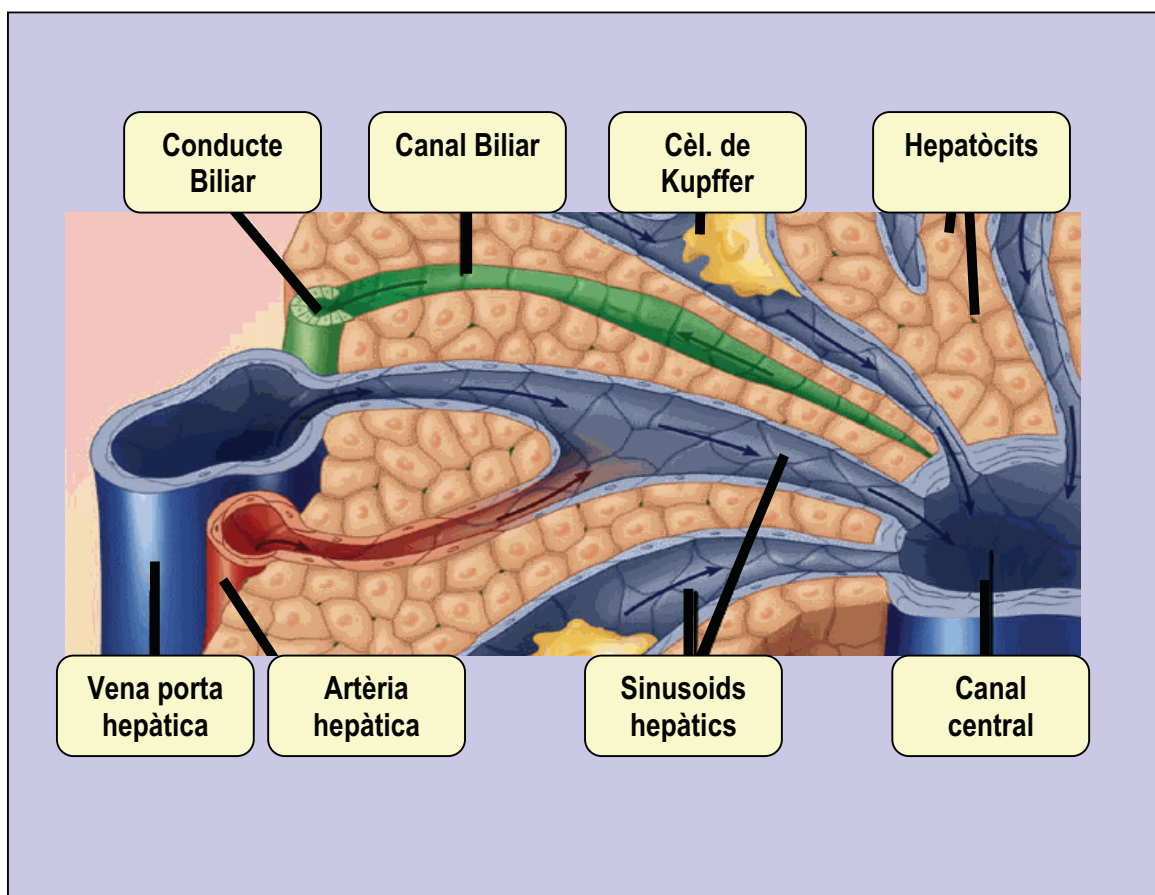
**FIGURA 1. Esquema representatiu dels diferents tipus cel·lulars presents al fetge.** Les cèl·lules de Kupffer es troben a l'interior del sinusoides hepàtic, mentre que les cèl·lules estelades es troben a l'espai de Disse. Procedent de SL Friedman [3].

A banda de les ja esmentades, al fetge també trobem les cèl·lules de Kupffer i les cèl·lules estelades o cèl·lules d'Ito. Les cèl·lules de Kupffer, derivades dels monòcits, són els macròfags residents i es troben situades a la paret sinusoidal. Es creu que són cèl·lules migratòries perquè no estableixen unions intercel·lulars amb les cèl·lules veïnes. Finalment les cèl·lules estelades,

situades a l'espai de *Disse*, són les que emmagatzemen vitamina A i segreguen diferents factors de creixement [2, 4].

Els hepatòcits es troben organitzats constituint unes estructures anomenades lobulets tal i com s'observa a la figura 2. El lobulet hepàtic clàssic té forma hexagonal, es troba organitzat en torn a una vena central i a cada cantonada d'aquest hexàgon podem veure una branca de la vena porta, una de l'artèria hepàtica i una del conducte hepàtic biliar juntament amb el conducte limfàtic.

Però també existeix una altra manera de definir el lobulet si considerem el conducte biliar com el lloc on es buida la secreció i al voltant es situa el parènquima hepàtic. Així es descriu l'anomenat lobulet hepàtic portal, l'ús del qual resulta més útil en certes situacions patològiques [1]



**FIGURA 2. Estructura del lobulet hepàtic.**

Una característica molt singular del fetge és que té una doble vascularització, ja que rep sang oxigenada de les artèries hepàtiques (dreta i esquerra) i sang rica

en nutrients a través de la vena porta. La sang surt del fetge per les venes hepàtiques, situades a la part posterior de l'òrgan, que buiden el seu contingut a la vena cava inferior [5].

El fetge està involucrat en l'homeòstasi de la glucosa. Els hepatòcits són les cèl·lules que, per unitat de pes, acumulen més glicogen. A partir d'aquest, o per la síntesi *de novo* (gluconeogènesi), el fetge pot alliberar glucosa per la sang. Té també funcions molt destacades en el metabolisme lipídic. És responsable de la formació de cossos cetònics i d'algunes lipoproteïnes com VLDL i HDL. Sintetitza albúmina i altres proteïnes, moltes d'elles essencials per a la coagulació de la sang (protrombina i fibrinogen); elabora la bilis i emmagatzema vitamines (A, del complex vitamínic B i D) i a més s'encarrega de la detoxificació de fàrmacs i de compostos tòxics de l'organisme [6]. També realitza funcions secretores ja que actua com a glàndula exocrina (segregant bilis cap al duodè) i com a glàndula endocrina (segregant hormones i proteïnes) [4].

## 2. ISQUÈMIA/REPERFUSIÓ

El dany produït per isquèmia/reperfusió (I/R) pot ser un problema clínic per a diferents òrgans com el cervell, cor, ronyó o fetge, i és un fenomen on el dany cel·lular en un òrgan hipòxic és accentuant per la subsegüent arribada d'oxigen. En el fetge, aquesta forma de dany va ser reconeguda com un desordre patològic clínic important per Toledo-Pereya et al. al 1975 durant estudis experimentals de trasplantament de fetge [7]. En aquest treball, es va observar que a vegades el fetge trasplantat desenvolupava congestió, trombosi progressiva i/o necrosi resultant en una fallida de l'òrgan. No va ser fins al 1980 que el terme dany per reperfusió no va ser generalment utilitzat en la literatura dels trasplantaments hepàtics.

El dany hepàtic per I/R pot ser categoritzat en I/R calenta i dany per reperfusió en fred. Un dany produït per I/R calenta pot donar-se durant trasplantaments, xocs circulatoris i reseccions de fetge per tumors. El dany produït per una reperfusió en fred, té lloc durant la preservació d'òrgans abans de ser trasplantats. Hi ha moltes similituds entre la patologia i el mecanisme patogènic del dany produït per I/R en calent i en fred.

### 2.1. ANATOMIA I RELLEVÀNCIA CLÍNICA

Com hem dit anteriorment, el subministrament aferent de sang al fetge ve per dos vies:

- l'**artèria hepàtica**, que porta sang oxigenada i representa aproximadament el 25% del flux hepàtic i el 50% de l'oxigen total.
- la **vena porta hepàtica**, que drena la circulació esplàncnica i representa aproximadament un 75% del flux sanguini hepàtic.

Tot i la seva protecció per un subministrament dual de sang i la seva capacitat pel metabolisme anaeròbic del glicogen emmagatzemat en el fetge, el dany hipòxic pot tenir lloc en aquest òrgan.

En estats de flux sanguini baix, el dany per hipòxia pot tenir lloc primer en la regió pericentral dels lòbuls hepàtics [8]. Si la hipòxia és més severa, es pot desencadenar una hepatitis isquèmica, caracteritzada per un increment dramàtic dels nivells d'aminotransferases (AT) en sèrum.

El dany produït per I/R causa fins a un 10% de les fallides d'òrgan, i arriba a tenir incidències més elevades en reseccions agudes. A més, el dany per I/R contribueix a disminuir la quantitat de fetges disponibles per a ser trasplantats a causa de l'elevada susceptibilitat dels fetges marginals a la isquèmia. En efecte doncs, minimitzar els efectes adversos del dany per I/R podrien significar un augment dels èxits en els trasplantaments hepàtics.

## **2.2. PROGRESSIÓ DEL DANY HEPÀTIC PRODUÏT PER I/R**

La isquèmia ja causa certa mort cel·lular per se, però el principal dany hepàtic es manifesta durant el procés de reperfusió.

El procés del dany produït per I/R combina molts factor interrelacionats que produeixen una **cascada de respostes** [figura 3] que culminen en una fallida hepàtica.

Hi ha una clara activació de:

- cèl·lules de Kupffer (KC)**
- cèl·lules polimorfonuclears (PMN)**
- cèl·lules endotelials (EC)**

Les cèl·lules de Kupffer, macròfags residents del fetge, es troben en l'espai sinusoïdal hepàtic, que sembla ser relativament resistent a la isquèmia i és activat durant la reperfusió. Un cop activat, produeix tota una sèrie de factors proinflamatoris, incloent citoquines com PGs, PAF, IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  i **espècies reactives d'oxigen (ROS)**, que són crítiques en la patogènesi del dany per I/R [9], ja que actuen directament com a citocines en les cèl·lules endotelials (EC) i hepatòcits, induint canvis en els seus receptors de membrana.



Les conseqüències finals d'aquest procés interrelacionat són alteracions tissulars causant disfuncions hepatocel·lulars. Els canvis histopatològics que tenen lloc en el fetge isquèmic durant la reperfusió inclouen una vacuolització, disrupció de l'endoteli i infiltració de neutròfils, a més d'alteracions en la microcirculació hepàtica.

De manera més minuciosa, podríem distingir dues fases durant el procés d'I/R:

### **fase inicial**

La fase inicial (< 2h després reperfusió) està caracteritzada per un estrès oxidatiu, on la producció i alliberació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) sembla ser directament la causant del dany hepatocel·lular.

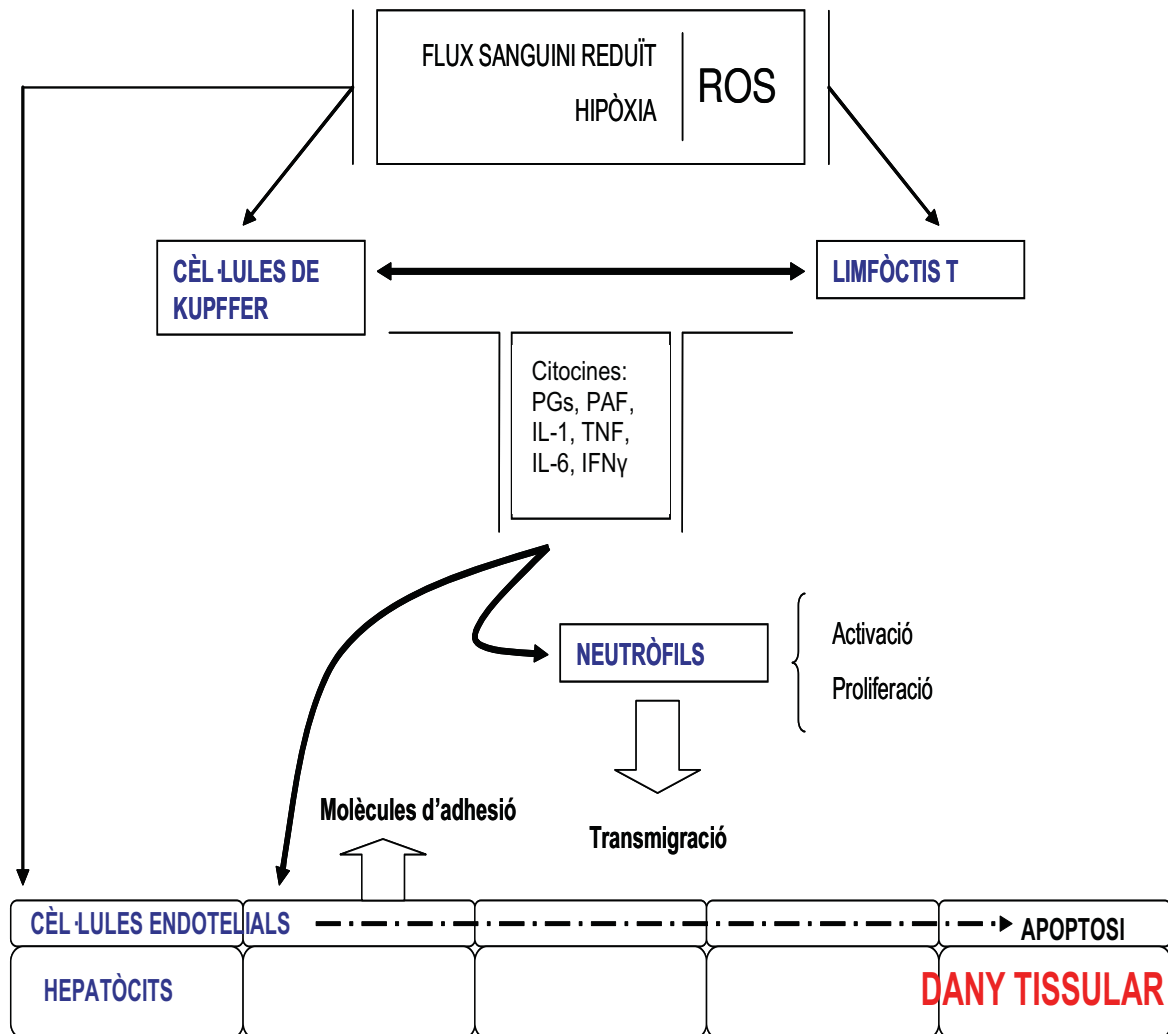
La primera conseqüència del dany produït per I/R per tant, és una anòxia que provoca una disminució dels nivells energètics de l'hepatòcit i afecta al funcionament enzimàtic. Hi ha una disminució d'adenosina trifosfat (ATP), s'acumula sodi intercel·lularment i es produeix un edema cel·lular [10]. La major part de la mort cel·lular durant la primera fase de reperfusió és necròtica.

L'activació del complement també és crítica en les fases inicials del dany per I/R ja que una disminució del complement redueix l'estrès oxidatiu induït per les KC [11, 12].

### **fase avançada**

La fase avançada del dany produït per I/R (entre 6 i 24h de reperfusió) és un desordre inflamatori mediat per un reclutament de neutròfils. Hi ha evidències de que les cèl·lules de Kupffer i els limfòcits T s'activen durant la reperfusió i desencadenen la resposta inflamatòria mediada per neutròfils. Els neutròfils activats també alliberen elastasa, catepsina G, heparanasa, col·lagenasa i enzims hidrolítics que són directament hepatotòxics. Es produiran tota una sèrie de citocines inflamatòries com TNF, interleuquines, prostaglandines, interferó, etc, que generaran més radicals i s'amplificarà la resposta inflamatòria activant més cèl·lules de Kupffer i neutròfils. Aquests neutròfils, actuen també com a citocines directes sobre les cèl·lules endotelials i els hepatòcits, i indueixen tota una sèrie de canvis en les membranes cel·lulars, les quals expressen molècules d'adhesió cel·lular i antígens MHC, facilitant les

interaccions de l'endoteli amb els neutròfils, de manera que aquests neutròfils s'aniran acumulant i migraran cap al teixit danyat per un procés de *rolling*.



**FIGURA 3. Cascada cel·lular en el dany induït per I/R.** Es generen radicals lliures que inicien la cascada inflammatòria que dona lloc al subsegüent dany hepàtic, caracteritzat per una activació i infiltració de neutròfils en el fetge durant la reperfusió. L'activació de les cèl·lules de Kupffer i dels limfòcits T promou l'acumulació de neutròfils, a més de l'increment en l'expressió de molècules d'adhesió com ICAM-1 en les cèl·lules endotelials. Les cèl·lules de Kupffer activades i els limfòcits T segreguen tota una sèrie de citocines que amplificaran la resposta inflammatòria i provocaran la destrucció de l'òrgan. Procedent de Fondevila et al. [13].

## **2.3. MECANISMES CEL·LULARS DEL DANY HEPÀTIC PRODUÏT PER I/R**

### **2.3.1. Paradoxa del pH**

Durant la isquèmia, el pH intracel·lular baixa com a resultat d'una glicòlisi anaeròbica i la hidròlisi de l'adenosina trifosfat (ATP) [14]. Aquesta acidosi metabòlica protegeix front la mort cel·lular necròtica als hepatòcits. Però la recuperació d'un pH normal durant la reperfusió de les cèl·lules isquèmiques, accelera la mort cel·lular. Aquest fenomen és anomenat "paradoxa del pH". Un increment del pH sembla que provoca dany cel·lular en la paradoxa del pH [15-17]. D'aquesta manera una inhibició de l'increment del pH després de la reperfusió prevé la necrosi hepatocel·lular en el dany per I/R.

### **2.3.2. MPT**

Hi ha estudis que impliquen la permeabilització transitòria de la mitocòndria com a procés clau en el dany cel·lular letal associat amb anòxia, reperfusió i estrès oxidatiu en hepatòcits i miòcits. Després d'una permeabilització de MPT, la mitocòndria esdevé lliurement permeable a soluts amb pes molecular < 1500Da [18]. ROS, elevades concentracions de  $Ca^{+2}$  i oxidants químics indueixen MPT;  $Mg^{+2}$ , pH baix i ciclosporina A disminueixen el dany cel·lular causat per anòxia i estrès oxidatiu [19].

### **2.3.3. Estrès oxidatiu i ROS**

L'estrès oxidatiu resulta d'un desequilibri entre prooxidants i antioxidants. Les cèl·lules poden adaptar-se a increments d'estrès oxidatiu, però si aquest esdevé agressiu, es produeix un desacoblament de les funcions cel·lulars i provoquen un dany irreversible o mort cel·lular.

Els radicals són probablement uns dels primers i més importants components del dany tissular després de la reperfusió en els òrgans isquèmics. Les principals espècies oxidants inclouen:

-el radical superòxid

-hidroxil

-peròxid d'hidrogen

Les principals fonts de producció de ROS en fetges isquèmics són les xantina oxidases, cèl·lules de Kupffer i els polimorfonuclears adherents o neutròfils [20]. El dany produït per radicals incideix sobre proteïnes, enzims, àcids nucleics, citoesquelet, membranes cel·lulars, peròxids lipídics, resultant en una disrupció en la funció mitocondrial i peroxidació lipídica [21]. El dany produït en les cèl·lules endotelials pels radicals provoca una pèrdua de la integritat microvascular i disminueix el flux sanguini.

La mitocòndria està reconeguda com la major font intracel·lular de ROS, i s'ha vist que intermediaris com el TNF- $\alpha$  i altres citocines proinflamatòries com la IL-1 o l'interferó- $\gamma$  poden generar ROS a través de la mitocòndria com a conseqüència d'un desacoblament en la cadena respiratòria [22].

Alguns esfingolípid, com la ceramida, també s'ha vist que poden incidir directament sobre la mitocòndria i induir la generació de ROS. Hi ha estudis que han descrit que la ceramida pot provocar una inhibició directa del complex III de la cadena respiratòria mitocondrial [23] al igual que provocar una disrupció de les funcions mitocondrials [24]. S'han detectat ceramides i glicolípid en mitocòndries purificades [25] i s'ha vist que s'acumulen després d'un tractament amb TNF [26].

Compostos endògens antioxidants com la superòxid dismutasa, la catalasa, glutatió,  $\alpha$ -tocoferols i  $\beta$ -carotens poden limitar els efectes dels ROS, però aquests sistemes poden ser ràpidament aclaparats per elevades quantitats de ROS [27].

#### **2.3.4. Cèl·lules de Kupffer**

Les cèl·lules de Kupffer (KC) són els macròfags residents del fetge i representen la població fixa més gran de macròfags en el cos i un 40-65% de les cèl·lules no parenquimals del fetge [28]. Un cop són activades, aquestes secreten mediadors proinflamatoris importants com les citocines, espècies reactives d'oxigen i òxid nítric [29]. Degut als diferents tipus de cèl·lules que hi

ha al fetge i a la proximitat que hi ha entre elles permetent interaccions cèl·lula-cèl·lula, les cèl·lules de Kupffer estan íntimament involucrades en el fetge en la resposta a l'estrès. Recentment, s'ha demostrat que durant la I/R hepàtica, s'alliberen lligands endògens dels hepatòcits danyats o necrosats que són reconeguts per les cèl·lules de Kupffer a través del toll-like-receptor 4 (TLR4), inicialitzant en aquestes cèl·lules la cascada de senyalització del TLR4 resultant en una inflamació i dany de l'òrgan [30, 31]. També s'ha descrit que la hipòxia per se pot ser activadora de les cèl·lules de Kupffer encara que aquest punt és objecte de debat. S'ha vist que el bloqueig de l'activitat de les cèl·lules de Kupffer amb **clorur de gadolini** redueix el dany hepatocel·lular en models animals [32, 33]. Per exemple, hi ha estudis on s'observa que els ratolins tractats amb clorur de gadolini, que inactiva les cèl·lules de Kupffer, bloqueja la fagocitosi i la subsegüent sortida dels mediadors inflamatoris, estant així protegits front el dany causat per I/R [31, 34].

### **2.3.5. Limfòcits T**

S'ha postulat que una isquèmia perllongada esdevé més immunogènica, per tant més susceptible a la resposta immune de les cèl·lules T [35]. De fet hi ha evidències que recolzen la importància de les cèl·lules T mitjançant ambdós danys per I/R a curt i a llarg termini.

El rol dels limfòcits en la I/R hepàtica és multifactorial. La demostració de que una immunosupressió sistèmica (CsA, FK506) atenua el dany hepatocel·lular després d'una I/R implica la participació dels limfòcits T en el dany patofisiològic [36].

L'adhesió dels limfòcits en els sinusoids hepàtics té lloc de manera primerenca durant la reperfusió i desacobla la funcionalitat hepàtica després de temps d'isquèmia perllongats [37]. Hi ha també dades que mostren que els limfòcits T CD4(+) circulants poden actuar com a mediadors cel·lulars en el reclutament de cèl·lules polimorfonuclears després d'una I/R hepàtica [38]. A més, l'efecte protector de la citocina antiinflamatòria IL-10 en models de dany per I/R relacionen no només la inhibició d'alliberació de citocines per les cèl·lules de Kupffer sinó també la inhibició dels limfòcits T residents [39].

### **2.3.6. Citocines i quimioquines**

#### **TNF**

El TNF (factor de necrosi tumoral) és una citocina pleiotròpica induïda per nombrosos tipus cel·lulars en resposta a diferents estímuls inflamatoris i immunomoduladors. Els efectes biològics del TNF s'estenen des de la inducció de mort cel·lular fins a promoure la regeneració cel·lular. El TNF pot mediar directament la toxicitat a la mitocòndria, i induir apoptosi o necrosi [40-42].

La generació de ROS formats predominantment per la mitocòndria és un altre factor que podria contribuir als efectes citotòxics del TNF.

El TNF s'allibera durant la reperfusió i es generen citocines inflamatòries com IL-1 en resposta al TNF. El TNF també indueix KC i es produeix més TNF [43, 44]. IL-1 també regula la producció de radicals pels neutròfils. A més, anticossos anti-TNF redueixen el dany hepàtic en models d'I/R hepàtica en rata. De la mateixa manera, la **pentoxifilina**, que suprimeix la producció de TNF per les KC, també pot disminuir el dany per I/R en models murins [45].

#### **INTERLEUCINES**

**-Interleucina-6** (IL-6) és una interleucina que pot actuar tant com a proinflamatòria com antiinflamatòria. És secretada pels limfòcits T i els macròfags per estimular la resposta al trauma, dany cel·lular i inflamació.

**-Interleucina-10** (IL-10) és una citocina important tant en la supressió de respostes immunoproliferatives com en respostes inflamatòries. S'ha vist que el subministrament d'IL-10 exògena regula a la baixa les funcions efectores dels macròfags incloent la producció de certes citocines inflamatòries com el TNF- $\alpha$  [46].

**-Interleucina-1 $\beta$**  (IL-1 $\beta$ ) és una interleucina bàsicament secretada per macròfags amb un efecte proinflamatori important.

En isquèmia/reperfusió *in vivo* s'allibera Interleucina-6 (IL-6), però aquest alliberament és retardat en comparació amb l'alliberament de TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , els

nivells sèrics dels quals són incrementats durant els primers minuts de la reperfusió [43, 44] .

L'alliberació d'IL-1 $\beta$  promou la producció de ROS, de manera que un antagonista del receptor d'IL-1 $\beta$  disminueix els nivells de TNF- $\alpha$  i també de dany hepàtic per I/R en rates [43].

També s'ha descrit una altra citocina proinflamàtoria, **interleucina-12** (IL-12), que s'expressa abans que el TNF- $\alpha$  i que la IL-1 $\beta$ , i podria ser crítica en la iniciació de la resposta hepàtica inflamàtoria [47], encara que aquest punt és objecte de controvèrsia a dia d'avui.

### **QUIMIOQUINES**

Les quimioquines són proteïnes de baix pes molecular que actuen com a quimioatracients de leucòcits potents. El TNF- $\alpha$  s'allibera després de la isquèmia i indueix l'alliberació de quimioquines. Entre elles destaquen la interleucina inflamàtoria IL-8, factors d'agregació plaquetars, quimioatracients de neutròfils induïts per citocines (CINC), proteïnes inflamàtores de macròfags (MIP)-1,2, quimioatracients de monòcits (MCP)-1,2,3 [18].

Aquestes quimioquines, sobretot els quimioatracients de neutròfils induïts per citoquines (CINC) són factors crucials que enllacen les primeres fases de l'activació de les cèl·lules de Kupffer amb la fase més avançada del dany produït per I/R mediat per neutròfils.

#### **2.3.7. Microcirculació**

La microcirculació hepàtica també es veu afectada en processos d'isquèmia reperfusió. Com més llargs són els episodis d'isquèmia, més fortes són les perturbacions en la microcirculació hepàtica durant la reperfusió [48, 49]. La causa d'una mala microcirculació és un desordre en la producció de vasoconstrictors i vasodilatadors.

S'ha demostrat que la inhibició de la síntesis d'òxid nítric (vasodilatador) provoca un increment en el dany per I/R [50, 51].

Al fetge trobem la sintasa d'òxid nítric induïble (iNOS) i la sintasa endotelial d'òxid nítric (eNOS).

La sintasa d'òxid nítric induïble pot ser expressada normalment en resposta a mediadors inflamatoris. Això activa NF- $\kappa$ B, que juga un rol molt important en la regulació de l'expressió del gen d'iNOS [52]. iNOS és independent dels nivells de calci per a la seva activitat i produeix òxid nítric a nivells més elevats que l'eNOS.

La sintasa d'òxid nítric endotelial s'expressa constitutivament a les cèl·lules endotelials dels sinusoides i és dependent dels nivells intracel·lulars de calci per a la seva activitat. En molts teixits, eNOS és important regulant el flux sanguini, produint òxid nítric en resposta als vasodilatadors endotelials i als estímuls físics com l'estrès.

Durant la isquèmia hepàtica, els nivells intracel·lulars de NADPH i d'oxigen disminueixen i l'activitat de la sintasa d'òxid nítric és essencial perquè els nivells d'òxid nítric també disminueixen. Durant la reperfusió, entren quantitats elevades de calci a les cèl·lules endotelials dels sinusoides i s'activa eNOS, produint una generació massiva d'òxid nítric [53]. Al mateix temps, els radicals activen NF- $\kappa$ B i hi ha un increment en l'expressió de la sintasa d'òxid nítric induïble [54].

Per altra banda, l'endotelina-1 (ET-1) és un potent vasoconstrictor que s'allibera durant la reperfusió i s'ha vist que un pretractament amb un anticòs, anti-ET-1, antagonista del receptor d'ET incrementa el flux de sang a nivell microvascular durant la reperfusió, atenuant així el dany tissular [55].

#### **2.4. SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR DURANT I/R**

El dany hepàtic generat per I/R genera dos tipus de mort cel·lular, apoptosi i necrosi en hepatòcits i en cèl·lules no parenquimals [56, 57]. Moltes molècules de senyalització intracel·lular són activades per I/R incloent el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) i la cinasa N-terminal c-Jun (JNK) [58].



### **2.4.1. NF-κB**

NF-κB és un factor transcripcional redox sensible identificat, inicialment, com una proteïna d'origen limfoide, que reconeix la regió *consensus* GGGACTTCC present en el promotor del gen de la cadena lleugera κ [59].

La regulació d'NF-κB és posttranscripcional, ja que es troba en el citoplasma de forma inactiva associat a una proteïna inhibidora de la família IκB [60, 61]. Front a diferents estímuls, es produeix l'alliberació de la proteïna inhibidora, que permet a NF-κB migrar al nucli cel·lular i regular l'expressió gènica.

NF-κB forma part d'una família de factors transcripcionals dimèrics que posseeixen dominis d'homologia Rel, i a través d'ells s'uneixen a l'ADN, interaccionen unes subunitats amb altres i amb les proteïnes inhibidores IκB.

La família Rel de proteïnes comprèn **dos grups** que es classifiquen en base a la seva estructura, funció i forma de síntesis [62]:

- **Grup I** : del que formen part les proteïnes p50 i p52. Sintetitzades a partir de les seves proteïnes precursoras p105 i p100, respectivament. Les proteïnes madures es caracteritzen per la presència d'un domini d'homologia Rel d'aproximadament 300 aminoàcids i que inclou la regió d'unió a l'ADN.
- **Grup II**: inclou les proteïnes Rel A (p65), c-Rel, Rel B i la proteïna dorsal de *Drosophila*, que a més de posseir el domini Rel, té dominis amb capacitat activadora de la transcripció. La família Rel/NF-κB pot formar homo o heterodímers. El dímer p65/p50 és el més comú i p65 és la subunitat amb major capacitat transactivadora. La dimerització és important funcionalment, ja que és necessària per la posterior unió a l'ADN del factor nuclear activat.

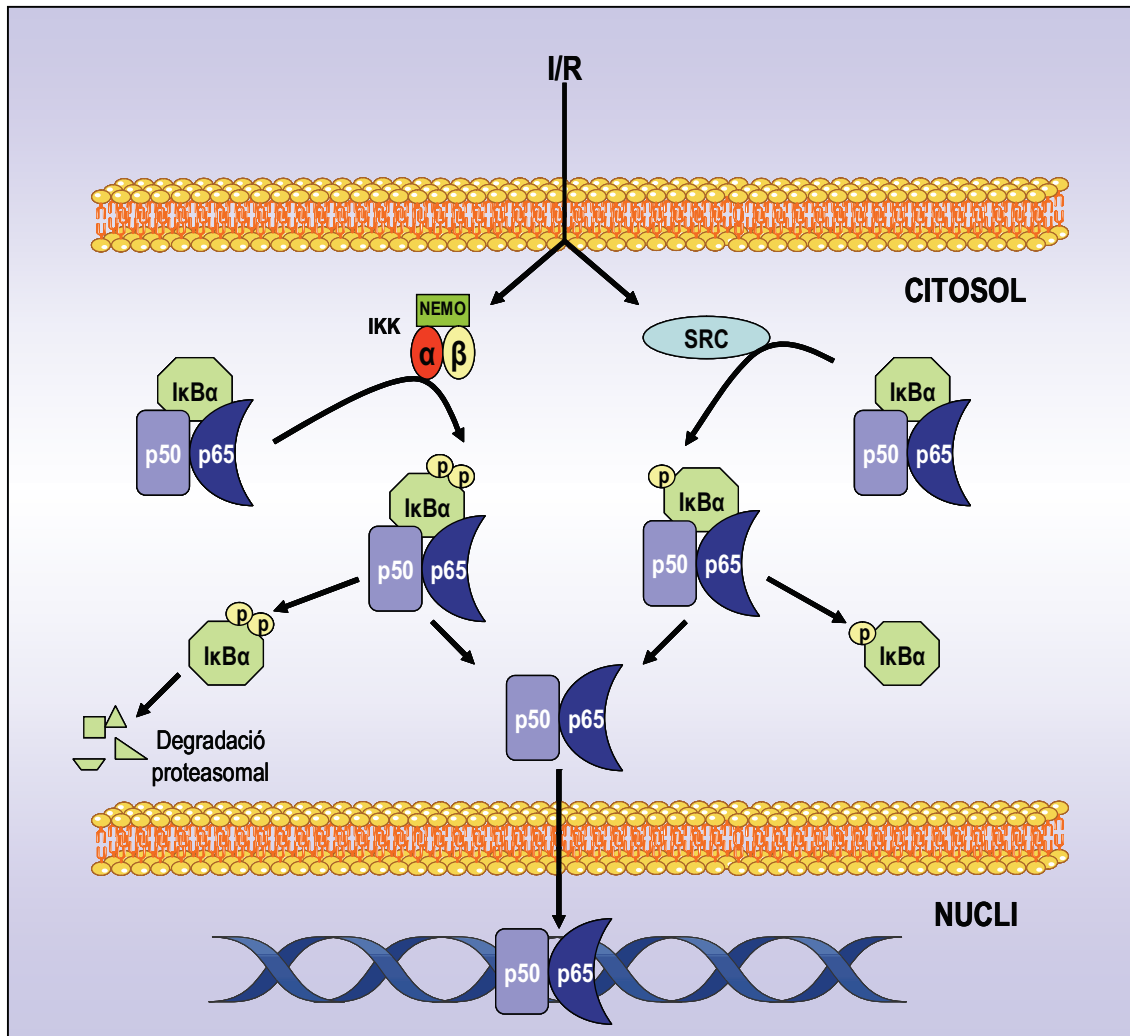
S'han proposat dos models divergents per l'**activació d'NF-κB** [figura 4]:

El primer, consisteix en la via d'activació clàssica, on s'activa el **complex IκB cinasa**, que està compost per tres subunitats IKK1 (o IKK-α), IKK2 (o IKK-β) i NEMO (NF-κB essential modulator) [63]. L'activació d'aquest complex de cinases resulta en la fosforilació d' IκB-α en els residus serina 32 i 36 per la subunitat IKK2. Un cop IκB-α és fosforilada, aquesta serà ubiquitinitzada selectivament en residus lisina, i posteriorment, degradada pel proteasoma 26S [63]. La dissociació d'IκB-α permet que quedi lliure la regió de l'extrem carboxi-

terminal que inclou la senyal de localització nuclear d'NF- $\kappa$ B, amb lo que ràpidament es translocarà al nucli on regula la transcripció dels seus gens diana.

Per altra banda, al 1994 dos treballs mostraven la fosforilació en tirosina d' I $\kappa$ B- $\alpha$  front a dos estímuls independents: durant el procés d'activació de neutròfils [64] i en resposta a la hipòxia [65], però el significat d'aquestes modificacions no estava clar. Finalment, al 1996, Imbert V et al. van mostrar que la fosforilació en el residu tirosina 42 d' I $\kappa$ B- $\alpha$  no resulta en la seva degradació, però sí en la seva alliberació del complex NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B- $\alpha$ , permetent l'activació d'NF- $\kappa$ B [66].

Aquest segon mecanisme de fosforilació en tirosina d'I $\kappa$ B- $\alpha$  ha estat menys estudiat, però sembla que requereix l'activació de les **cinases de la família Src**, com p56Lck, ZAP-79, i c-Src [67-70]. S'ha descrit que c-Src és una tirosin cinasa regulada per redox i activa NF- $\kappa$ B per fosforilació d'I $\kappa$ B- $\alpha$  en residus tirosina 42 [66, 70-72].



**FIGURA 4.** Vies d'activació d'NF-κB en hepatòcits després d'una isquèmia/reperfusió. Procedent de Jaeschke et al. [73].

*In vivo*, sembla que tenen lloc els dos mecanismes durant el dany produït per I/R, reflectint la complexitat del procés, que inclou estrès oxidatiu, producció de citocines proinflamatòries i hipòxia. Estudis recents han demostrat que NF-κB està activat durant la I/R en el fetge [74-76], però la rellevància funcional de l'activació d'NF-κB i el rol de les IKKs en el dany per I/R no està del tot clar. Per exemple, Luedde et al [77] demostren que una deficiència d'IKK2 prevé l'activació d'NF-κB en fetge.

Però també s'ha vist que la generació intracel·lular de ROS després de la I/R activa Src, resultant en una fosforil·lació d'IκB en els residus tirosina, de manera que es dissocia l'heterodimer p50-p65 de la seva subunitat inhibidora IκB i es

segueix d'una translocació nuclear [66, 78, 79]. Engelhardt et al realitzaren un estudi amb ratolins knock-out de la regió tirosina d'I $\kappa$ B- $\alpha$  on s'observa una disminució en l'activació d'NF- $\kappa$ B després de la isquèmia/reperfusió respecte els ratolins salvatges, demostrant així la rellevància de la fosforilació en tirosines d'I $\kappa$ B a través de c-Src [78]. A més, el mecanisme d'activació d'NF- $\kappa$ B mediat per Src per una fosforilació en tirosines d'I $\kappa$ B s'ha descrit durant la hipòxia en varis tipus cel·lulars, incloent els hepatòcits [71, 74, 80]. També cal tenir en compte estudis recents que han demostrat que nivells baixos de GSH (principal antioxidant cel·lular) disminueixen la capacitat transactivadora d'NF- $\kappa$ B en hepatòcits, involucrant el mecanisme dependent o independent d'IKK en funció del grau de disminució dels nivells de GSH. Això vol dir que amb disminucions moderades de GSH, NF- $\kappa$ B és capaç d'emigrar al nucli, però no pot transcriure els seus gens diana, si en canvi són disminucions més acusades es bloqueja també l'activació d'IKK impedit així l'activació i translocació al nucli d'NF- $\kappa$ B [81].

L'activació d'NF- $\kappa$ B juga un paper controvertit en el dany induït per I/R ja que indueix tant gens protectors com proinflamatoris [82, 83]. Per exemple, s'ha vist que l'activació hepàtica d'NF- $\kappa$ B disminueix el dany per I/R i millora els trasplantaments ortotòpics de fetge, mentre que també s'ha mostrat que una inactivació d'NF- $\kappa$ B protegeix el fetge front I/R [77, 84-86]. Aquestes discordances s'han justificat en base als diferents graus d'activació d'NF- $\kappa$ B residual segons els mecanismes utilitzats per a bloquejar la seva activació. Així, mentre que un bloqueig total d'NF- $\kappa$ B pot ser deteriorant ja que no permet l'activació dels gens de supervivència, una inhibició moderada d'NF- $\kappa$ B pot suprimir l'activació dels mediadors proinflamatoris, i en canvi permetre la inducció dels gens protectors.

Aquesta dicotomia d'NF- $\kappa$ B en promoure o prevenir el dany produït per I/R podria reflectir la seva **funció específica segons el tipus cel·lular** com a activador transcripcional, és a dir l'expressió de gens NF- $\kappa$ B depenents segons el tipus cel·lular, com cèl·lules parenquimals i cèl·lules de Kupffer. Això, és un aspecte important de l'activació d'NF- $\kappa$ B durant el dany produït per la I/R hepàtica que resta per aclarir. L'activació d'NF- $\kappa$ B en les cèl·lules de **Kupffer** sembla ser presumiblement la responsable de la onada de generació de

citocines proinflamàtòries a l'inici de la reperfusió. La funció d'NF-κB en els **hepatòcits** durant el dany postisquèmic tampoc està ben definida, però varis estudis documenten del rol crític d'NF-κB en prevenir l'apoptosi en resposta al factor de necrosis tumoral α (TNF-α) [87, 88].

#### **2.4.2. JNK**

La cinasa N-terminal c-Jun (JNK) forma part de la família de les MAP cinases, i és un enzim que és fosforilat i s'activa en situacions d'estrès [89]. És estimulat per citocines inflamàtòries com TNF-α [90] i IL-1 [91], radiacions i estrès oxidatiu [92, 93]. El TNF-α activa fortament JNK, que fosforila les seves dianes c-Jun, ATF-2, i JunD. Aquests factors de transcripció formen part dels membres de la família AP-1 (proteïna activadora - 1) i indueixen la transcripció dels gens depenents d'AP-1, molts d'ells estan involucrats en la regulació d'inflamació, proliferació i mort cel·lular.

Estudis recents han proposat que JNK també pot interaccionar directament amb la mitocòndria provocant la sortida de citocrom c i donant lloc a l'apoptosi [94-97].

S'ha vist que JNK és activat durant la isquèmia/reperfusió hepàtica degut a l'estrès cel·lular, i és fortament induït per TNF-α [98] i per les espècies reactives d'oxigen (ROS) mitjançant dany hepàtic en aquest procés [91, 99].

El TNF-α soluble (sTNF) s'uneix al TNF-R1 mentre que el TNF-α de membrana (mTNF) s'uneix al TNF-R2. Ambdós receptors de TNF recluten proteïnes adaptadores TRADD, TRAF2 i RIP per activar la via d'IKK i JNK. Una activació perllongada de JNK requereix de la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS), ja que la producció de ROS contribueix a l'activació de JNK oxidant i inactivant varis membres de les MAP cinasa fosfatases (MKP). L'activació perllongada de JNK declina el balanç cap a la mort cel·lular induint la fosforilació de la E3 lligasa Itch i la subsegüent ubiquitinització i degradació de l'inhibidor de caspasa-8 c-Flip, regulat per NF-κB. L'activació d'NF-κB evita l'activació prolongada de JNK i la mort cel·lular induint la transcripció d'antioxidants com la manganès superòxid dismutasa (MnSOD). Una curta activació de JNK també pot induir proliferació per l'activació de c-Jun [83] [figura 5].

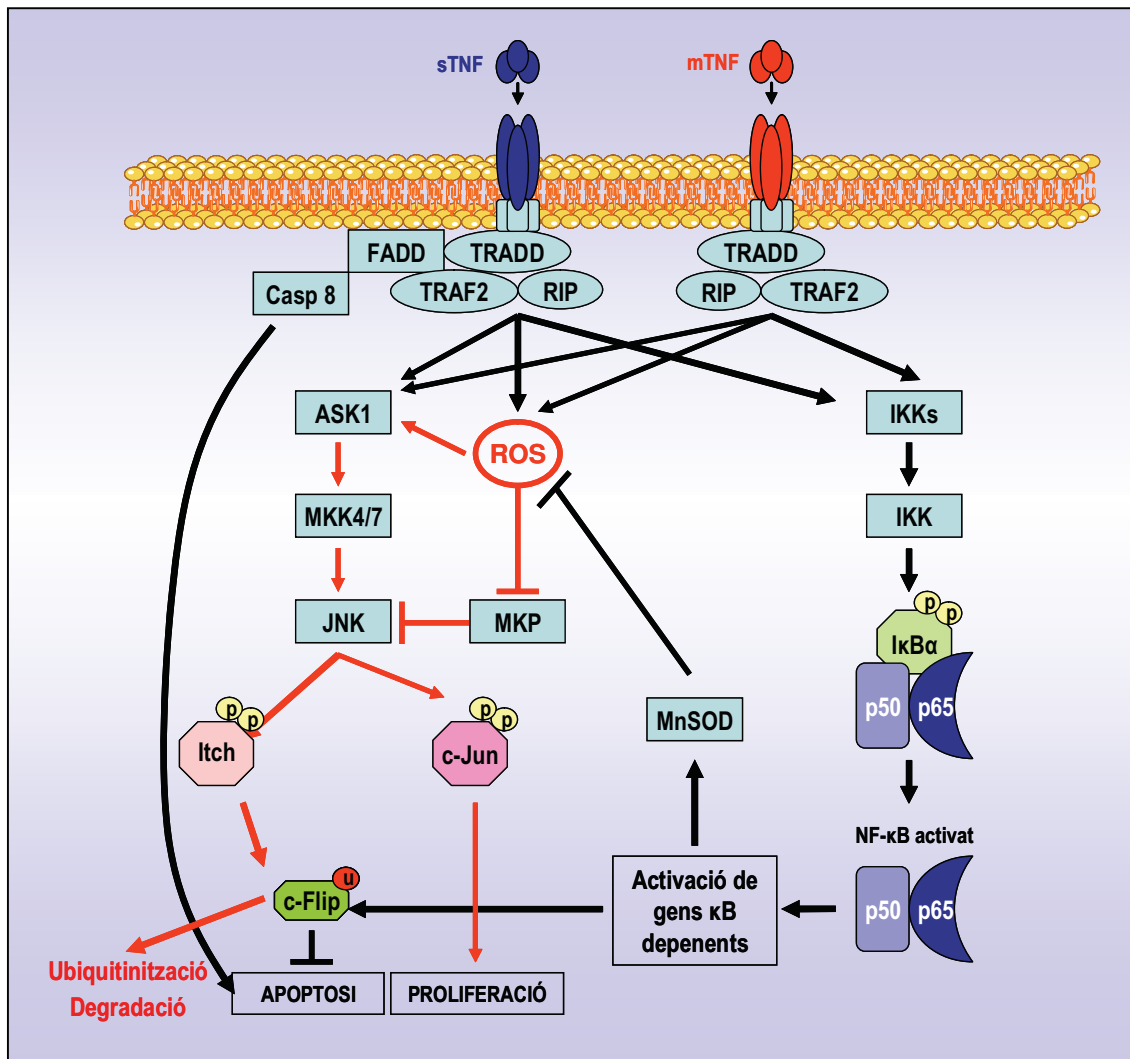


FIGURA 5. Rol d'IKK, JNK i ROS en la inducció de la mort cel·lular i proliferació induïda per TNF- $\alpha$ . Procedent de Schwabe RF et al. [83].

### 2.4.3. AKT

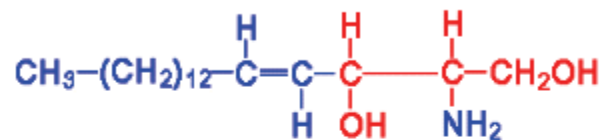
La via de AKT/fosfatidilinositol 3 (PI3) cinasa és una via important de supervivència involucrada en la protecció front a diferents estímuls. L'activació d'aquesta via promou la viabilitat cel·lular en part per la modulació de varis factors implicats en l'apoptosi [100, 101].

Estudis recents han vist que la via d'Akt juga un rol important en la protecció front el dany induït per I/R. Per exemple, s'ha vist que AKT suprimeix l'activació de molts moduladors d'apoptosis com són Bad, GSK- $\beta$  (glicogen sintasa cinasa  $\beta$ ) i caspasa-3 [102, 103].

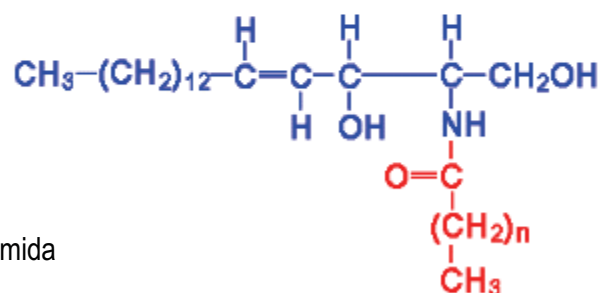
### 3. ELS ESFINGOLÍPIDS

#### 3.1. ESTRUCTURA MOLECULAR

Els esfingolípidis són importants components de les membranes lipídiques que contenen una base esfingoide de cadena llarga, com l'esfingosina [figura 6], un enllaç amida, un àcid gras de cadena llarga i un cap amb un grup polar. [104, 105]. Depenent de la identitat d'aquest grup polar es diferencien diversos subtipus, com la ceramida (grup hidroxil) [figura 6], l'esfingomielina (fosforilcolina) [figura 7] o els glicoesfingolípidis (carbohidrats) entre els que destaquen els gangliòsids. Aquests últims són lípids complexos, components estructurals de les membranes cel·lulars que participen en el manteniment de la seva integritat i fluïdesa.



Esfingosina



Ceramida

---

**FIGURA 6.** Esfingosina i ceramida.

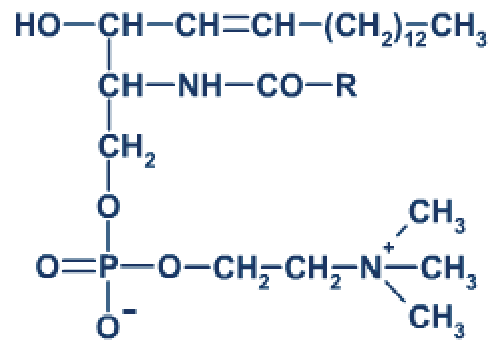


FIGURA 7. Esfingomielina.

### 3.2. METABOLISME ESFINGOLIPÍDIC

Els esfingolípidis inicien la seva síntesi en el reticle endoplasmàtic a partir del seu precursor la **ceramida** rere l'acció coordinada de la serin-palmitoil transferasa (SPT) i la ceramida sintasa (CS). La síntesi de ceramida comença amb la condensació de L-serina i palmitoil-CoA per formar 3-cetoesfinganina, pas limitant en la síntesi de ceramida, per l'acció de la SPT. 3-cetoesfinganina és reduïda a la base esfingoide esfinganina per l'enzim 3-cetoesfinganina reductasa, que després serà acetilada per la ceramida sintasa (CS) per generar dihidroceramida. Aquest compost, biològicament inactiu, és oxidat a ceramida al introduir-se un doble enllaç entre els carbonis 4 i 5 en posició trans per l'acció de la dihidroceramida desaturasa.

La via de síntesi **de novo** de la ceramida requereix per tant, l'acció coordinada de la SPT i la CS per generar ceramida [figura 8].

A més de la síntesi de *novo*, la ceramida pot ser generada per l'activació de fosfolipasses específiques com són les **esfingomielinases** (SMases), capaces d'hidrolitzar l'enllaç fosfodiéster de l'esfingomielina. Han estat caracteritzades diverses esfingomielinases, dues de les quals són de rellevant importància en senyalització: l'**esfingomielinasa neutra**, que es troba en membranes amb un pH òptim de 7.4 i l'**esfingomielinasa àcida**, dependent de  $\text{Zn}^{+2}$  i generalment localitzada en compartiments endo/lisosomals [106, 107].



Aquestes esfingomielinases poden activar-se ràpidament a través de mecanismes mediatos per receptors cel·lulars i per l'acció de diverses drogues.

Un cop generada, la ceramida pot acumular-se causant els diferents efectes citotòxics que se li atribueixen i/o ser convertida a diferents metabòlits depenent de l'estímul i del tipus cel·lular.

Així, la ceramida pot ser deacetilada per l'acció de les **ceramidases** (CDases) àcides i neutres generant **esfingosina**, que pot ser fosforilada per l'acció de l'**esfingosina cinasa** (SK) formant **esfingosina-1-fosfat** (S1P), esfingolípid potent amb propietats antiapoptòtiques [104, 108-111].

Anàlogament, la ceramida pot ser emmagatzemada en forma d'**esfingomielina** (SM) per transferència de fosforilcolina a la ceramida via **esfingomielina sintasa** (SMS).

Alternativament, a partir de la ceramida es poden derivar els **glicoesfingolípid**s mitjançant l'acció de **glicosiltransferases** especialitzades que transfereixen un residu de glucosa a la ceramida per produir **glucosilceramida** (GlcCer) a la superfície citosòlica de l'aparell de Golgi, o bé per l'addició de galactosa i formar així **galactosilceramida** al reticle endoplasmàtic. La majoria dels glicoesfingolípid s deriven de la glucosilació més que de la galactosilació de la ceramida.

La **GlcCer**, generada per l'enzim limitant glucosilceramida sintasa (GCS), és després transferida al lumen del Golgi, on servirà de base per a la formació de glicoesfingolípid s complexes com els **gangliòsids**, entre els quals destaca el gangliòsid GD3 per la seva acció proapoptòtica, mitjançant l'addició seqüencial de galactosa, àcid siàlic i N-acetilgalactosamina [112]. El gangliòsid GD3 pot interaccionar amb la cadena respiratòria mitocondrial i generar ROS [113]. En paral·lel GD3 és capaç d'interrompre la senyalització d'NF-κB, disminuint els nivells nuclears de p65 [114], induïts per diferents estímuls. Aquesta acció de GD3 s'ha observat en diferents situacions patològiques, alhora que s'ha proposat com a agent potenciador de l'acció dels quimioteràpèutics [115].

A la figura 8 podem veure representat esquemàticament el metabolisme que dels esfingolípid s que hem descrit fins ara.

A més de les vies clàssiques de generació de ceramida, hi ha observacions que han previst evidències d'una nova via on la ceramida pot ser generada a partir dels glicoesfingolípids a la membrana plasmàtica [116].

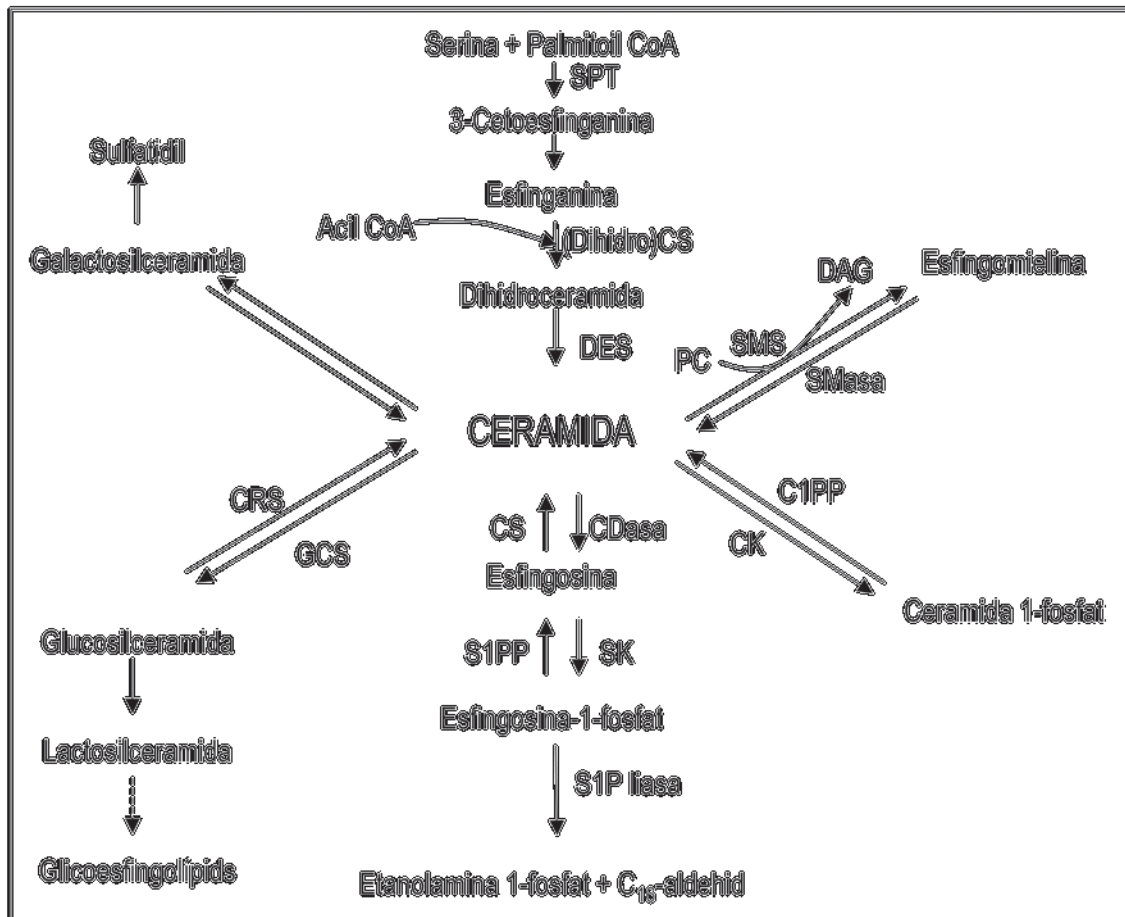


FIGURA 8. Esquema del metabolisme esfingolipídica. Procedent de Ogretmen and Hannun [110].

### **3.3. FUNCIONS BIOLÒGIQUES**

El concepte inicial dels esfingolípidis com a simples constituents de les membranes biològiques, ha estat qüestionat en els últims anys per nombroses dades que demostren la participació dels esfingolípidis en el control de diferents mecanismes cel·lulars incloent proliferació, diferenciació cel·lular, mort cel·lular apoptòtica, contracció cel·lular, retracció i migració [104, 110, 117, 118].

#### **3.3.1. Regulació de la mort cel·lular per esfingolípidis**

Els esfingolípidis, com hem dit, són segons missatgers en diferents processos tals com proliferació cel·lular, diferenciació i mort cel·lular. En particular, la implicació de la **ceramida** en la resposta a l'estrès i en la mort cel·lular és de gran interès a nivell cel·lular i molecular. De fet, la ceramida, ha estat àmpliament descrita com a inductora i/o medidora clau d'apoptosi front a estímuls causants d'estrès oxidatiu i en especial pel tractament amb quimioteràpia o radiació ionitzant [104, 119, 120].

Diferents evidències sostenen un paper crític de la ceramida en la inducció d'apoptosi:

- Els nivells de ceramida incrementen abans de la mort cel·lular [104, 110, 121], implicant que aquesta generació és una causa més que una conseqüència de la mort cel·lular.
- increments de ceramida per tractaments amb SMases o agents farmacològics que interfereixen amb enzims del seu metabolisme mimetitzen aquests efectes d'estrès i inducció d'apoptosi [122].
- models gènics com cèl·lules de pacients amb Niemann-Pick (deficients en activitat ASMasa) o els ratolins knockout de l'ASMasa i de la glucosilceramida sintasa presenten les anomalies previsibles en la resposta a l'estrès [120, 122, 123].

S'han descrit els esfingolípidis com a promotors de vies de mort cel·lular depenents de la participació del RE i/o la mitocòndria. Per exemple, s'ha

demostrat que C2-ceramida, anàleg permeable de la ceramida, indueix estrès en el RE i subsegüent mort cel·lular [124].

A més, la mort cel·lular apoptòtica induïda per cannabinoids en cèl·lules tumorals està mediada per un increment primerenc en els nivells de ceramida per la inducció de la SPT, enzim responsable de la síntesis de *novo* de la ceramida a partir de la serina i la palmitoil-CoA, i l'increment dels nivells de ceramida al RE activa la mort cel·lular induïda pel RE.

També s'ha demostrat una gran evidència del rol de la mitocòndria en la mort cel·lular induïda per ceramida. S'ha vist que la ceramida interacciona amb el complex III de la mitocòndria, resultant en un increment de generació de radicals (ROS), facilitant l'alliberació de citocrom c al citosol i l'activació de caspases [26, 125, 126].

Estímuls apoptòtics, com lligands de mort cel·lular (ex. Fas i TNF), agents quimioterapèutics o radiacions ionitzants, activen esfingomielinases específiques encara que el lloc precís intracel·lular de generació de ceramida per SMases no està ben establert.

El rol de l'esfingomielinasa àcida en la mort hepatocel·lular induïda per TNF ha estat observada mostrant la resistència dels ratolins knockouts en ASMasa al dany hepàtic induït per TNF endogen o exogen *in vivo* [123, 127].

A part de l'evident rol de la ceramida en la regulació de la mort cel·lular induïda per estrès, la ceramida és precursora per la síntesis de glicoesfingolípid complexos (GSLs), com els gangliòsids. En particular, el gangliòsid GD3 ha promogut atenció considerable degut al seu rol emergent com a efector de mort cel·lular. Tal com amb ceramida, incrementen els nivells cel·lulars de GD3 en resposta a Fas o TNF [113, 128], la inhibició de la GD3 sintasa, enzim responsable de la síntesis de GD3 a partir del seu precursor GM3, prevé la inducció de mort cel·lular produïda per Fas, TNF o  $\beta$ -amiloids [128-130].

### **3.3.2. Regulació de vies de supervivència**

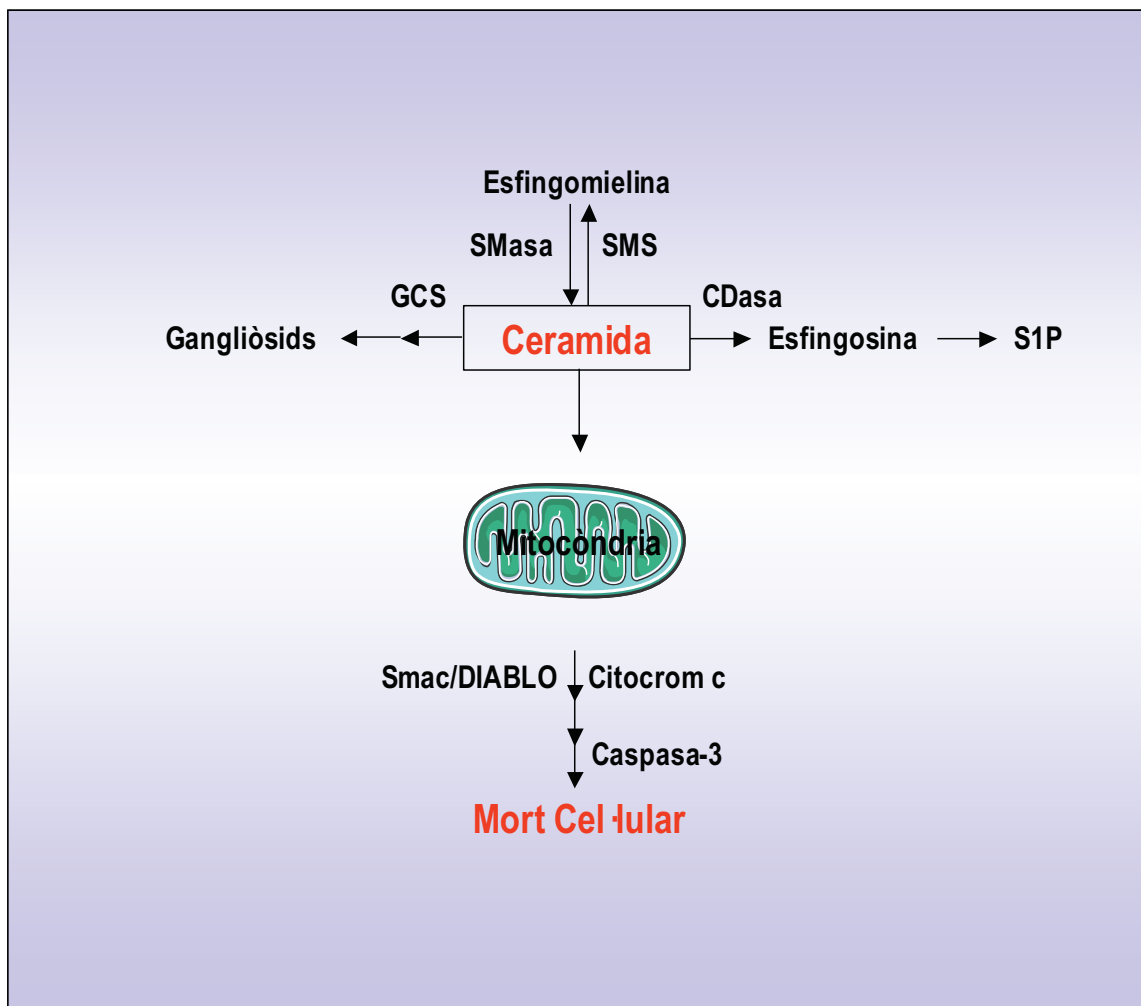
L'activació d'SMases o de la síntesi de *novo* de ceramida no sempre condueixen a mort cel·lular.

Això és degut a la coexistència d' esfingolípidis com la ceramida o el gangliòsid GD3 que promouen la mort cel·lular, i d'altres com l'**esfingosina-1-fosfat** (S1P) que tenen propietats antiapoptòtiques i activen vies de supervivència i proliferació. Així, l'equilibri entre aquests esfingolípidis determinaria la supervivència o mort de les cèl·lules [108, 131]. Per exemple, s'ha observat que la sobreexpressió de la ceramidasa a fibroblasts L929 protegeix de l'acció citotòxica del TNF mitjançant l'elevació de ceramida i afavorint la conversió d'esfingomielina a esfingosina-1-fosfat amb funció antiapoptòtica [132] .

Degut a la participació dels esfingolípidis en les vies de mort cel·lular, els nivells intracel·lulars d'esfingolípidis estan altament regulats. Vàries vies catabòliques són induïdes pels mateixos estímuls per eliminar lípidis proapoptòtics per preservar la integritat cel·lular. Per exemple, ceramidases i/o esfingosines cinasa, que transformen la ceramida a S1P, són activades per nombrosos estímuls externs incloent citocines inflamatòries, radiació o agents quimioterapèutics. L'S1P intracel·lular mobilitza calci d'acúmulis interns independentment d'inositol trifosfat, a més d'activar vies de senyalització que generen proliferació cel·lular i supervivència. S'ha vist que la inducció d'apoptosi mediada per ceramida per la droga anticancerígena doxorubicina pot ser bloquejada per l'S1P.

L'existència d'aquestes vies de senyalització oposades controlades pel balanç dinàmic entre la concentració d'S1P i ceramida són factors importants en la determinació de la supervivència o mort cel·lular.

A més del paper intracel·lular de l'S1P com a supressor de mort cel·lular regulada per ceramida, i promotor del creixement cel·lular, també s'ha vist que la unió de S1P als receptors S1PR regula funcions cel·lulars com angiogènesi i maduració vascular [133].



**FIGURA 9. Representació esquemàtica de les principals vies involucrades en el metabolisme de la ceramida.** Increments de ceramida estan associats a la ràpida activació de l'esfigomielinasa (neutra, NSMasa i àcida, ASMasa). La ceramida pot ser catabolitzada per l'acció de la ceramidasa (neutra, NCDasa i àcida, ACDasa) per formar esfingosina, que és fosforilada per formar el lípid antiapoptòtic esfingosina-1-fosfat (S1P). També pot ser glicosilada per la glucosil ceramida sintasa (GCS), primer pas de la síntesi de gangliòsids. I també pot ser metabolitzada per l'esfigomielina sintasa (SMS) per incrementar els nivells d'esfigomielina (lípid integrador de membranes).

### **3.4. ELS ESFINGOLÍPIDS EN LA ISQUÈMIA/REPERFUSIÓ**

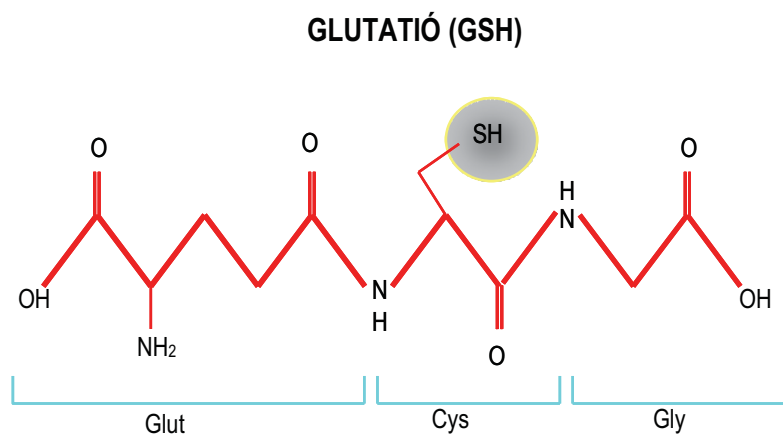
L'apoptosi, o mort cel·lular programada, és reconeguda com a clau en el dany produït per isquèmia/reperfusió, essent el factor de necrosi tumoral (TNF) un element crític en aquest procés [45]. El TNF juga un paper central en moltes formes de dany hepàtic, entre elles la causada per I/R, i la informació en la senyalització de la mort cel·lular (hepatocel·lular) per TNF podria tenir una important rellevància per al tractament de malalties hepàtiques. En aquest context, la ceramida ha emergit com un lípid intermediari que juga un rol important en la resposta a l'estrès i mort cel·lular induïda per TNF [104]. Tot i que els nivells de ceramida poden incrementar per la via de síntesis *de novo*, la hidròlisi de la esfingomielina mitjançant l'activació d'esfingomielinases (SMases), tant l'àcida com la neutra, constitueix una via efectora ràpida i habitual per a la generació de ceramida després de la unió del TNF al seu receptor de membrana [134]. En particular, resultats previs han demostrat que l'esfingomielinasa àcida està implicada en l'apoptosi hepatocel·lular i el dany hepàtic induït pel TNF [123, 127].

Els radicals lliures generats durant la reperfusió i la influència del TNF en el dany hepàtic per isquèmia/reperfusió apunten als esfingolípidis com a possibles mediadors. A més, s'han observat increments en els nivells hepàtics de ceramida en processos d'isquèmia freda i reperfusió en calent [58], tot i que les seves conseqüències i regulació no han estat prèviament caracteritzades.

De forma similar, malgrat haver-se descrit la regulació d'esfingomielinases en un model d'I/R en rata, on l'esfingomielinasa neutra era estimulada durant la reperfusió del fetge isquèmic, al mateix temps que l'activitat de l'esfingomielinasa àcida es veia disminuïda [135], el seu impacte en la regulació de la ceramida i la seva contribució en el dany hepàtic per I/R no ha estat avaluat.

## 4. EL GLUTATIÓ

El glutatió (GSH) [figura 10] és el tiol de baix pes molecular més abundant a la cèl·lula, en concentracions de l'ordre milimolar, amb gran eficàcia estructural i participa activament en nombrosos processos de desintoxicació. Es tracta d'un tripèptid,  $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina, constituït pels aminoàcids glutamat i glicina, responsables del seu destí metabòlic, i la cisteïna on el seu grup sulfhidril (-SH), gràcies al seu potencial reductor, és el responsable de les seves funcions metabòliques. El GSH és determinant per l'estat redox de la cèl·lula i ajuda a mantenir les proteïnes en estat reduït [136].



**FIGURA 10.** Estructura química del glutatió (GSH).

### 4.1. SÍNTESI DE GLUTATIÓ

El GSH és sintetitzat a totes les cèl·lules de mamífers, però els principals òrgans encarregats de l'homeòstasi del GSH són el fetge, pulmó i ronyó.

La seva biosíntesi, com veiem a la figura 11, és el resultat de l'acoblament seqüencial de dues reaccions enzimàtiques dependents d'ATP, catalitzades pels enzims:  **$\gamma$ -glutamilcisteïna sintasa** ( $\gamma$ -GCS) i la **GSH sintasa** (GS) [137].

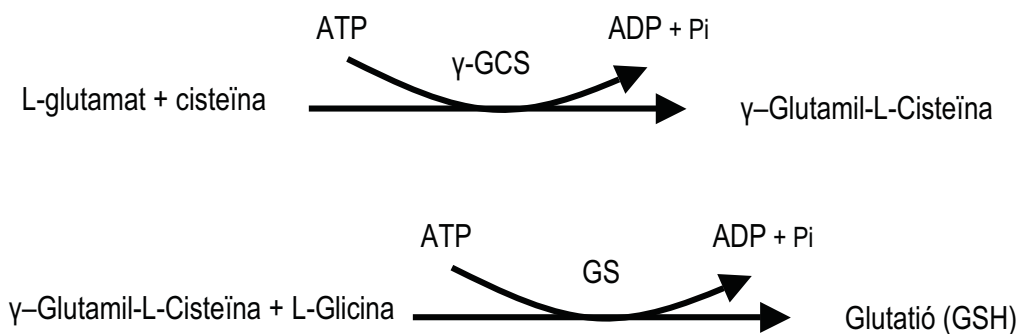


El primer pas en la síntesi del GSH és catalitzat per l'enzim **γ-glutamilcisteïna sintasa** i és l'etapa limitant de la síntesi del GSH. Es produeix la unió del glutamat i la cisteïna a través del grup γ-carboxil del glutamat i el grup α-carboxil de la cisteïna, que impedeix la seva degradació intracel·lular. L'única peptidasa capaç d'hidrolitzar el GSH és la γ-glutamiltanspeptidasa, enzim encarregat del seu transport i present a la superfície externa de certs tipus cel·lulars.

L'activitat de la γ-GCS presenta retroinhibició per producte, impedit així una sobreproducció d'aquest compost, a més pot ser inhibida específicament i de forma irreversible per la **butionina L-sulfoximina** (BSO) [138].

S'ha observat que el ratolí deficient en la γ-GCS no és viable, demostrant que la síntesi de GSH és indispensable durant les etapes inicials del desenvolupament en mamífers.

Finalment, la síntesi es completa amb la unió de glicina al dipèptid γ-glutamilcisteïna a través de l'enzim **GSH sintasa** que no és retroinhibit pel glutatió. La glicina, com a aminoàcid terminal, és bàsic en l'especificitat estructural dels enzims dependents de GSH i confereix protecció front a la degradació intracel·lular produïda per la γ-glutaminciclotransferasa [139-141].



**FIGURA 11. Síntesi del Glutatió.**

El GSH es distribueix als orgànuls intracel·lulars, tals com el reticle endoplasmàtic, el nucli i la mitocòndria. En aquesta última localització subcel·lular es troba entre un 10-15% de tot el glutatió de la cèl·lula, majoritàriament en forma reduïda, en proporció 100:1 per GSH:GSSG. Aquest

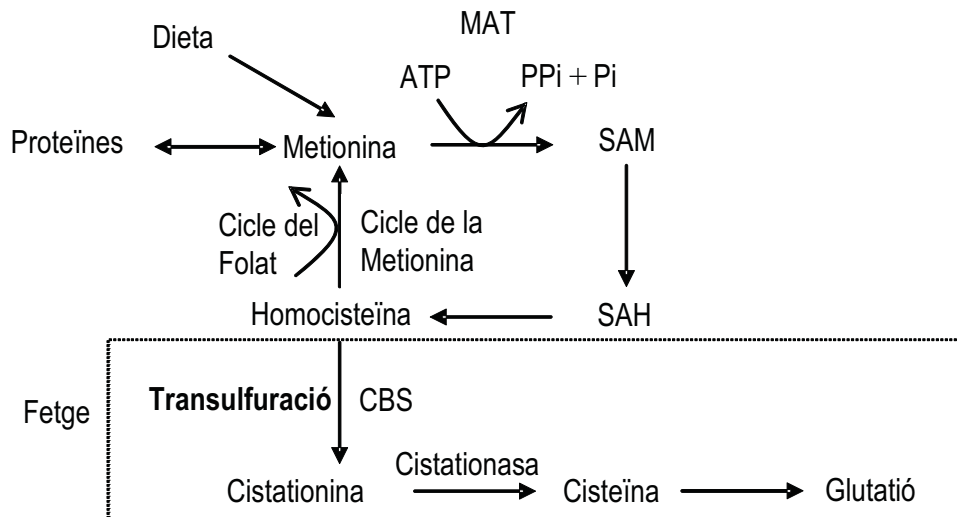
equilibri es manté gràcies a l'enzim glutatió reductasa, que requereix NADPH per catalitzar el pas de GSSG a GSH. Per tant, podem dir que els nivells de GSH/GSSG estan íntimament lligats als nivells de NADPH, els quals estan lligats a l'estat energètic de la cèl·lula, i el poder reductor de la cèl·lula determinarà en gran mesura aquest balanç GSH/GSSG.

#### **4.2. VIA DE LA TRANSULFURACIÓ**

L'habilitat de les cèl·lules del fetge per convertir la metionina a cisteïna, procés que es coneix com la **transulfuració** [figura 12], és important ja que el fetge és el major òrgan d'emmagatzament de GSH i reservori de cisteïna. El nivell intracel·lular de cisteïna és crític per a la velocitat en la biosíntesis del GSH. La via de la transulfuració és activa especialment en els hepatòcits, essent absent en altres cèl·lules no parenquimals [139].

El primer pas de la transulfuració requereix ATP i implica l'activació de la metionina a S-adenosilmetionina (SAM). El pas següent és una desmetilació i es produeix homocisteïna, que s'uneix a la serina per formar cistationina gràcies a l'enzim cistationina sintasa. En aquesta via, la homocisteïna i la metionina són ràpiament interconvertibles (reacció reversible), però el pas a cistationina és irreversible. La cistationina, per mitjà de l'enzim cistationasa, passarà a cisteïna, i aquesta podrà ser utilitzada per la síntesi del GSH.

Casos de hipòxia i nivells baixos d'ATP afecten a la via de la transulfuració, i a la síntesi de GSH.



**FIGURA 12. Esquema general del cicle de la metionina.** En el fetge l'homocisteïna pot entrar a la via de la transulfuració per produir cisteïna, que s'utilitza per la síntesi de glutatió. MAT: metionina adenosil transferasa. CBS: cistationina  $\beta$ -sintasa.

### **4.3. FUNCIONS DEL GLUTATIÓ**

La concentració intracel·lular de GSH és un indicador molt sensible de la funcionalitat i viabilitat cel·lular. De fet, el desenvolupament de diferents patologies s'ha vist acompanyat d'una disminució dels nivells de glutatió [142].

Les principals funcions són:

#### **- Emmagatzament de cisteïna**

La cisteïna en plasma és ràpidament autooxidada a cistina, fenomen que implica una marcada toxicitat. La disminució d'aquest efecte nociu s'aconsegueix controlant els nivells de cisteïna lliure o mitjançant l'emmagatzament d'aquesta en forma de GSH, on el grup  $-SH$  és menys làbil que el de la cisteïna lliure [143]. De manera que quan el GSH és hidrolitzat extracel·lularment es recupera la cisteïna.

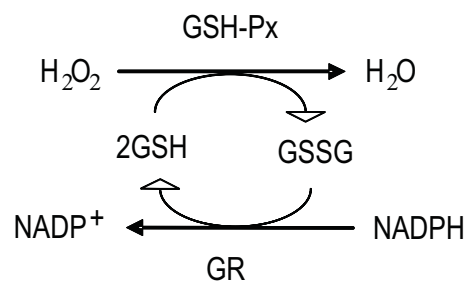
#### **- Desintoxicació**

La desintoxicació de xenobiòtics o dels seus metabòlits és una de les principals funcions del GSH. Aquests compostos electròfils es conjuguen amb el GSH,

tant de manera espontània com catalitzada per l'enzim glutatió S-transferasa (GST) , donant lloc a mercapturats que seran posteriorment eliminats.

- **Reducció de peròxids d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) i peròxids orgànics, i detoxificació d'espècies reactives d'oxigen (ROS)**

Si el peròxid d'hidrogen no és reduït a aigua, en presència de certs metalls de transició ( $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ), pot donar lloc a través de la reacció de Haber-Weiss, a la formació del radical hidroxil ( $OH\cdot$ ) altament reactiu i responsable de la formació de peròxids lipídics. La GSH peroxidasa depenent de seleni catalitza la reducció del peròxid d'hidrogen a aigua utilitzant el GSH com a cofactor, donant lloc a la formació de l'espècie oxidada del glutatió (GSSG). En presencia de NADPH, el GSSG es reduït de nou a GSH per la GSH reductasa, establint-se d'aquesta manera el denominat cicle redox del GSH [figura 13].



**FIGURA 13. Eliminació del peròxid d'hidrogen de les cèl·lules i la seva transformació a aigua per l'enzim glutatió peroxidasa (GSH-Px).** En aquesta reacció el glutatió reduït (GSH) es converteix a la seva forma oxidada (GSSG), però després, si l'estat energètic de la cèl·lula ho permet, és revertit novament a GSH per l'acció de la glutatió reductasa (GR).

- **Integritat de grups tiols i reducció de ponts disulfur generats per estrès oxidatiu**

Els grups tiols de les seves cisteïnes poden oxidar-se modificant els ponts disulfur i l'estructura de les proteïnes. De forma que és important el manteniment dels nivells de tiols essencials en proteïnes, prevenint la seva oxidació o reduint unions disulfur induïdes per l'estrès oxidatiu.

- **Conjugació de compostos endògens**, com els intermediaris del metabolisme de les prostaglandines, leucotriens i vàries hormones.

- **Modulació de processos relacionats amb microtúbuls**
- **Reducció dels ribonucleòtids a desoxirribonucleòtids**

#### **4.4. GLUTATIÓ MITOCONDRIAL**

El GSH és sintetitzat en el citosol cel·lular i la seva disponibilitat en els diferents compartiments cel·lulars està determinada per interaccions complexes entre la seva utilització, transport, síntesi i la taxa de reducció del GSSG a GSH [144]. El glutatió mitocondrial (mGSH) es troba en una concentració similar a la del citosol, de 9-12 mM [145]

##### **4.4.1. Funcions del glutatió mitocondrial**

###### **- Reducció de l' $H_2O_2$ generat en la respiració mitocondrial**

Com a conseqüència del metabolisme aeròbic cel·lular es generen radicals superòxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) i  $H_2O_2$  com a subproductes de la respiració mitocondrial, espècies reactives que poden conduir a l'oxidació de lípids de membrana i d'altres macromolècules interferint en processos metabòlics. Donat que la mitocòndria no té catalasa, la detoxificació d'  $H_2O_2$  depèn exclusivament del glutatió mitocondrial i de l'activitat de l'enzim GSH peroxidasa [146]. Aquest enzim és de gran rellevància a nivell mitocondrial i per poder realitzar la reducció de les espècies oxidades utilitza el glutatió reduït (GSH), els nivells dels quals estan altament regulats; doncs si disminueix la seva concentració es pot arribar a produir una disfunció mitocondrial i mort cel·lular [147].

###### **- Manteniment de la viabilitat cel·lular**

El glutatió mitocondrial (mGSH) té un paper fonamental en la viabilitat cel·lular [148]. Per exemple, s'ha observat que la disminució selectiva dels nivells de mGSH precedeix a la mort apoptòtica en timòcits [149] i sensibilitza als hepatòcits front a l'estrès oxidatiu i TNF- $\alpha$  [150, 151]. A més, juga un paper clau en el manteniment de la funcionalitat mitocondrial a través de la regulació de la

permeabilitat de la membrana mitocondrial interna, mantenint els grups sulfhidrils en estat reduït [152].

#### **4.5. EL GLUTATIÓ EN LA ISQUÈMIA/REPERFUSIÓ**

Tot i que encara hi ha incerteses considerables en els esdeveniments bioquímics que porten al dany causat per isquèmia/reperfusió, està ben establert que l'estat metabòlic energètic és un dels desordres funcionals més importants en termes de predicció de la viabilitat de l'òrgan isquèmic. Durant les últimes dècades, hi ha hagut esforços experimentals considerables que s'han focalitzat en el rol de les espècies reactives d'oxigen derivades de la isquèmia/reperfusió hepàtica. S'ha associat la reperfusió del fetge isquèmic amb modificacions oxidatives i desacoblament funcional de la mitocòndria [153, 154]. La mitocòndria produeix de manera exclusiva adenosina trifosfat (ATP), que és indispensable pel manteniment de la integritat cel·lular. Les espècies reactives d'oxigen (ROS) que es generen durant la isquèmia/reperfusió desestabilitzen el sistema de producció energètica de la cèl·lula.

**El glutatió** és probablement l'antioxidant endogen més potent de la cèl·lula ja que neutralitza molts tipus de radicals, ja sigui directament o conjuntament amb la glutatió peroxidasa [139, 155]. El glutatió està present a concentracions molt elevades en el fetge i a més el fetge exporta quantitats considerables de glutatió a la sang [156]. Per això, el sistema redox del glutatió juga un rol central com a mecanisme de defensa contra els radicals generats durant la isquèmia/reperfusió hepàtica.

A més, el glutatió juga un rol molt important en protegir la mitocòndria contra el dany induït per isquèmia/reperfusió [157], ja que la mitocòndria al no tenir catalasa depèn exclusivament del glutatió mitocondrial i de l'activitat de l'enzim GSH peroxidasa per tal de detoxificar els radicals que es generen durant aquest procés [146].

Està establert que l'administració d'antioxidants, com el glutatió, o precursors del glutatió com la S-adenosil-L-metionina (SAM), la N-acetil cisteïna (NAC) o la

$\gamma$ -glutamilcistein etil éster (GCE) afavoreixen al manteniment de la viabilitat cel·lular en isquèmia/reperfusió [157-160]. En canvi, no està tant clar si aquesta funció protectora la realitzen per una eliminació dels radicals produïts durant la I/R o per la seva actuació sobre altres rutes de senyalització.

## **5. FORMES DE MORT CEL·LULAR**

Existeixen dos formes de mort cel·lular: necrosi i apoptosi. Les característiques morfològiques i bioquímiques d'ambdós tipus de mort cel·lular permeten establir clares diferències entre elles. Tant la necrosi com l'apoptosi poden produir-se simultàniament en el mateix teixit, inclús en la mateixa cèl·lula [161].

### **5.1. NECROSI**

La **necrosi** és el resultat d'un trastorn metabòlic accidentat amb una reducció dels nivells energètics, pèrdua d'ATP i activació d'enzims degradadors. Això produeix una lisi cel·lular amb una alliberació de components cel·lulars al medi extracel·lular, activant processos d'inflamació. La necrosi oncòtica és típicament la conseqüència d'una pertorbació metabòlica com en el cas de la isquèmia/reperfusió o d'una elevada hepatotoxicitat induïda per drogues, també es pot desencadenar per altres canvis ambientals com temperatures extremes o traumatismes mecànics entre d'altres estímuls.

### **5.2. APOPTOSI**

L'**apoptosi**, és un procés fisiològic que afecta només a determinades cèl·lules. És dependent d'ATP i és una mort cel·lular programada que segueix una seqüència d'esdeveniments controlats i ben organitzats per la cèl·lula. La membrana cel·lular no es destrueix, lo que evita l'alliberació a l'espai extracel·lular del seu contingut, resultant un procés "silenciós" sense inflamació. En el citoplasma es produeix una granulació fina, amb conservació d'alguns òrgans, en especial les mitocòndries, l'ADN es condensa i hi ha fragmentació nuclear. A més, la membrana cel·lular es va recollint encapsulant els elements deteriorats del citoplasma i nucli, formant els anomenats cossos apoptòtics que solen ser fagocitats per les cèl·lules veïnes.



La mort cel·lular programada o apoptosi pot produir-se per dos vies: la via extrínseca també coneguda com la via dels receptors de mort, i la via intrínseca o mitocondrial [162]

### **5.2.1. via extrínseca**

La **via extrínseca**, s'activa amb senyals proapoptòtiques des de l'exterior de la cèl·lula i comporta la lligació i/o oligomerització dels receptors de la superfície cel·lular per desencadenar la via apoptòtica.

Els receptors de mort cel·lular pertanyen a la superfamília de receptors del factor de necrosi tumoral i són proteïnes transmembrana que tenen tres dominis:

-domini extracel·lular que interacciona amb el lligand

-domini transmembrana

-domini intracel·lular de mort

Els receptors de mort cel·lular més importants en fetge són:

-Fas (CD95/Apo-1)

-TNFR-1 (tumor necrosis factor receptor 1)

-TRAIL-R1 (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1)

-TRAIL-R2

-TRAIL-R3

-TRAIL-R4

La unió dels corresponents lligands a cada receptor (FasL, TNF- $\alpha$  i TRAIL) causa la oligomerització i activació dels receptors, que promouran vies de senyalització intracel·lulars.

Els dominis intracel·lulars dels receptors activats s'associen amb varies proteïnes adaptadores i es desencadenarà la cascada apoptòtica [163]. FasL i TRAIL recluten la proteïna adaptadora FADD (*Fas associated death domain*) i promouen la unió de la procaspasa-8 formant així l'anomenat DISC (*death-inducing signalling complex*). L'activació proteolítica de la procaspasa-8 dóna

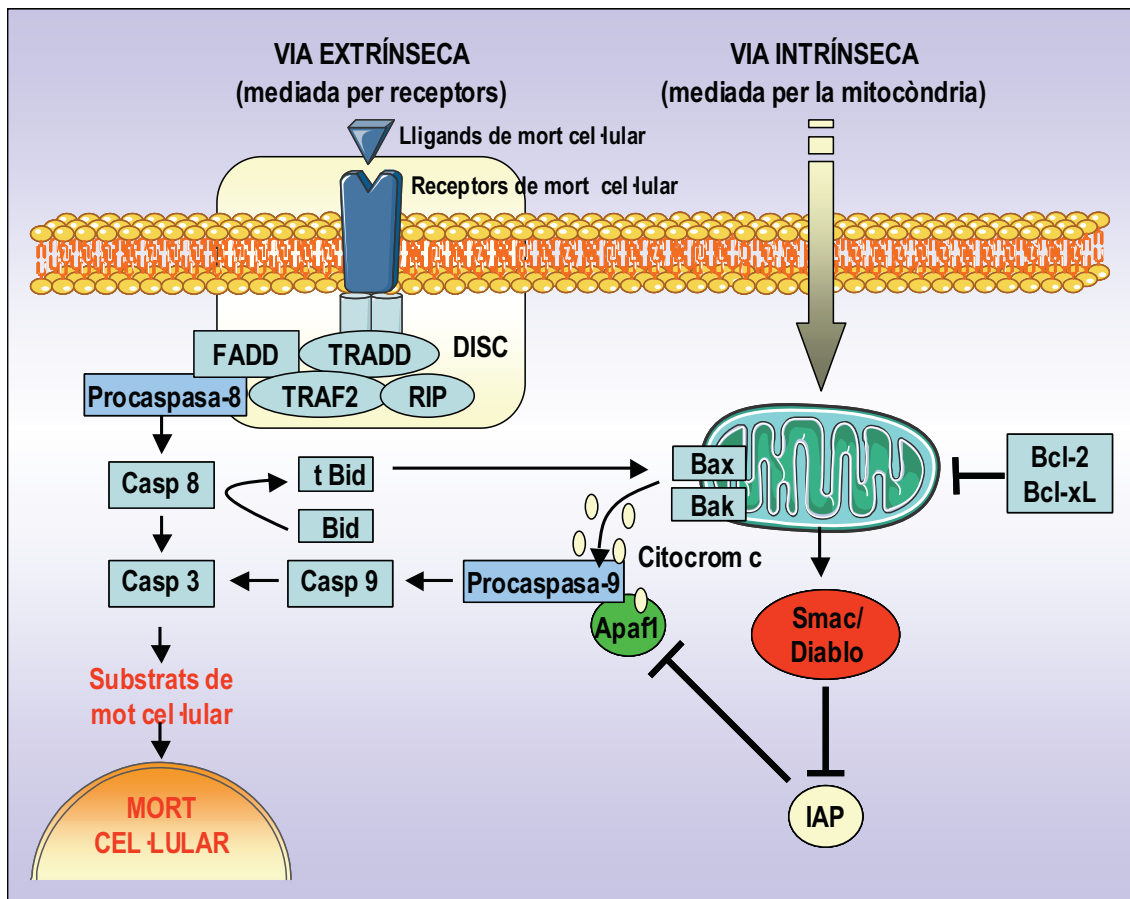
lloc a la caspasa efectora catalítica caspasa-8 [164]. Si hi ha suficient generació de caspasa-8 al seu receptor, la caspasa-8 pot activar directament la procaspasa-3 i desencadenar el procés apoptòtic.

El TNF promou el reclutament de les proteïnes adaptadores TRADD (*TNF receptor associated death domain*), RIP-1 (*receptor interacting protein 1*) i TRAF-2 (*TNF receptor associated factor*) al receptor de membrana TNF-R1.

TNFR1 és algo diferent dels receptors de Fas i TRAIL, ja que primer activa NF- $\kappa$ B i JNK (cinasa N-terminal c-Jun) i després s'activa la cascada apoptòtica [163].

### **5.2.2. via intrínseca**

La **via intrínseca o mitocondrial**, es desencadena degut a vàries alteracions com són el dany a l'ADN, canvis en el calci intracel·lular, estrès en el reticle endoplasmàtic i falta de factors de creixement. Es basa en la permeabilització mitocondrial i l'alliberació de nombroses proteïnes de l'espai intermembrana; entre elles, el **citocrom c** [figura 14]. Un cop alliberat de la mitocòndria, el citocrom c, forma un complex amb el factor activador d'apoptosis-1 (APAF-1), ATP i la procaspasa-9. Aquest complex s'anomena **apoptosoma**, que proteolíticament activa la caspasa 9. Un cop que aquesta és activada, actua sobre les caspases efectores com la caspasa-3, que dóna lloc a l'apoptosi [164]. Aquestes dues vies, intrínseca i extrínseca, no són mútuament excloents, sinó que a vegades es necessita la via mitocondrial per amplificar la senyal apoptòtica dèbil produïda per la unió dels lligands als seus receptors de mort. A més un cop s'activa la caspasa-8, aquesta provoca el trencament de Bid, membre de la família de proteïnes Bcl-2, a un fragment actiu tBid, que es transloca a la mitocòndria. La translocació de tBid a la mitocòndria provoca la obertura del porus mitocondrial i l'activació de caspasa-9 [165].



**FIGURA 14.** Esquema de les vies intrínseca i extrínseca de mort cel·lular apoptòtica. Procedent de Newmeyer and Ferguson-Miller [166].

### **5.3. PERMEABILITAT MITOCONDRIAL**

Els mecanismes que indueixen la permeabilització mitocondrial de proteïnes apoptogèniques de l'espai intermembrana al citosol són controvertits. Actualment, existeixen dues teories: la ruptura no específica de la membrana mitocondrial externa produïda per un inflament de la matriu mitocondrial, i la formació de canals autònoms per membres de la família de proteïnes Bcl-2.

#### **5.3.1. Permeabilitat mitocondrial transitòria**

En hepatòcits,  $\text{TNF-}\alpha$  i Fas provoquen la formació del porus mitocondrial transitori (MPT). MPT té lloc al produir-se una obertura del porus mitocondrial que és altament conductiu a soluts de pes molecular d'aproximadament 1500

Da [167]. A conseqüència d'això, la mitocòndria es despolaritza, i s'infla. Això provoca el trencament de la membrana mitocondrial externa i la sortida de proteïnes de l'espai intermembrana.

El porus mitocondrial transitori està format per un canal d'anions depenent de voltatge (VDAC) a la membrana externa i el translocador de nucleòtids d'adenina (ANT) i la ciclophilina D [168-170].

### **5.3.2. Permeabilitat per proteïnes de la família Bcl-2**

Un altre mecanisme pel qual es produeix una sortida de citocrom c és el mediat per proteïnes de la família Bcl-2. Aquestes proteïnes contenen almenys una de les quatre regions conservades anomenades dominis homòlegs de Bcl-2 (BH1-BH4). Es subagrupen en tres famílies:

-els membres antiapoptòtics (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-xW, Mcl-1 i A1/bfl-1) que presenten quatre dominis.

-els membres proapoptòtics (Bax, Bak, Bok/Mtd) que no tenen el domini BH-4

-els membres proapoptòtics (Bim, Bid, Bad, BMF, Bik/Nbk, Noxa, Puma/Bbc3 i Hrk/DP5) que només presenten el domini BH3.

La majoria d'ells presenten un domini C-terminal que els hi permet associar-se a membranes. L'heterodimertització de les proteïnes de la família Bcl-2 sembla ser crucial en la regulació de la permeabilització mitocondrial.

Diferents membres de la família Bcl-2 (inclosos Bcl-xl, Bcl-2, Bax i Bid truncat) formen canals funcionals d'ions, essent depenents de voltatge i de pH, a més de poc selectius. Les proteïnes proapoptòtiques Bax o Bak pateixen canvis conformacionals, de manera que el seu extrem N-terminal queda exposat. Bax, que normalment es troba en el citosol o dèbilment unit a la mitocòndria, es transloca a aquest orgànel, s'oligomeritza i s'inserta a la membrana mitocondrial externa (MME) causant la permeabilització. Aquests processos poden ser activats per tBid, la forma truncada i activa de Bid, i inhibits per Bcl-2 i Bcl-xl.

En alguns models tBid, interacciona amb Bax o Bak i forma canals a la membrana mitocondrial externa que provoquen la sortida de citocrom c i Smac/DIABLO. De totes maneres, la naturalesa d'aquests canals no és ben coneguda [171-173].

Bcl-2 i altres proteïnes de la família Bcl-2 bloquegen la sortida de citocrom c. El mecanisme pel qual Bcl-2 exerceix una funció antiapoptòtica podria involucrar un bloqueig del MPT i/o antagonistes de Bax/Bak.

#### **5.4. LA MORT CEL·LULAR EN LA ISQUÈMIA/REPERFUSIÓ**

Durant la reperfusió s'activen varies proteïnes proapoptòtiques, incloent les proteases caspasa-8 i caspasa-3, i hi ha sortida del citocrom c de la mitocòndria al citoplasma. Aquesta cascada finalment culmina amb una destrucció del DNA nuclear i mort cel·lular. Però, hi ha hagut moltes controvèrsies en si la mort cel·lular que s'observa en el parènquima hepàtic durant la reperfusió és necròtica o apoptòtica [174, 175]. Alguns investigadors estableixen que la major part del dany parenquimal és provocat per una necrosi massiva [174]. En canvi, altres mostren com una inhibició específica de l'apoptosi prevé el dany parenquimal i millora la supervivència de l'animal després de períodes llargs d'isquèmia [176, 177].

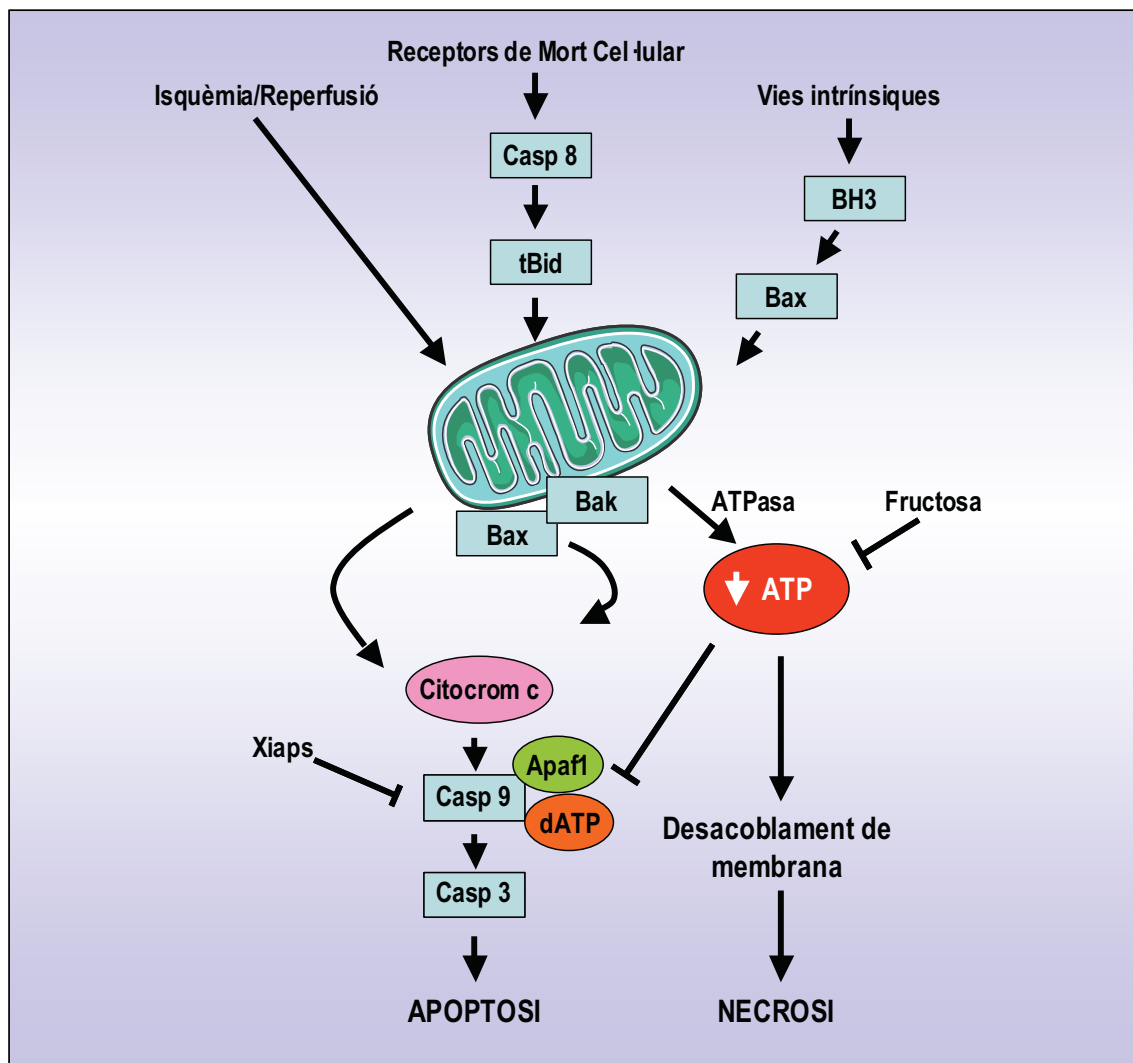
Siguin els que siguin els esdeveniments que culminen amb una sortida de citocrom c de la mitocòndria al citoplasma, causen una disfunció global de la mitocòndria amb una despolarització de la membrana mitocondrial i desacoblen la fosforilació oxidativa de la cadena respiratòria. Per això, els mateixos mecanismes que promouen la sortida de citocrom c i l'apoptosi poden causar una baixada dels nivells d'ATP i generar una subsegüent mort cel·lular necròtica. Tot i que l'apoptosi i la necrosi es consideren fenòmens diferents i independents, els dos models de mort cel·lular coexisteixen en les patologies hepàtiques [178, 179]. Aquesta teoria anomenada **necrapoptosi** va ser desenvolupada per Lemasters al 1999 [179].

En la isquèmia, la glicòlisi anaeròbica i la hidròlisi de l'ATP disminueixen ràpidament el pH del teixit. Això protegeix a les cèl·lules d'una necrosi massiva tot i la davallada dels nivells d'ATP, però quan el pH fisiològic retorna als seus nivells normals durant la reperfusió, es permeabilitza la membrana mitocondrial interna, hi ha una despolarització mitocondrial i una elevada mort cel·lular.

La necrosi i l'apoptosi, comparteixen mecanismes. La permeabilitat mitocondrial transitòria (MPT) és el mecanisme comú responsable dels dos tipus de mort cel·lular i el balanç entre la disminució dels nivells d'ATP després de l'MPT i la generació d'ATP per la glicòlisi determina si la mort cel·lular és necròtica o apoptòtica després de la isquèmia/reperfusió.

Per tant, induint l'MPT en la isquèmia/reperfusió poden produir-se ambdós tipus de mort cel·lular apoptòtica o necròtica, i segons les circumstàncies particulars del cas predominarà un tipus de mort cel·lular o un l'altre, de manera que pot ser que la mort cel·lular sigui apoptòtica en un principi, però si el dany és més acusat i disminueixen els nivells d'ATP fins a tal punt que ja no es pot suportar la senyalització apoptòtica (depenent d'ATP), tindrà lloc la necrosi oncòtica. Per tant, els nivells d'ATP són els determinants entre la necrosi i l'apoptosi.

Quan la mort cel·lular necròtica es prevé amb fructosa, pot donar-se de nou l'activació de caspasa-3 i generar una mort cel·lular apoptòtica.



**FIGURA 15. Necrosi i apoptosi com a vies alternatives de la permeabilitat mitocondrial.**  
 Procedent de Malhi et al. [180].

## **6. ESTRATÈGIES DE PROTECCIÓ FRONT I/R**

En els últims anys, han incrementat els esforços per prevenir o mitigar el dany produït per la isquèmia/reperfusió hepàtica. Les estratègies s'han focalitzat en:

- millorar els procediments de preservació dels òrgans.
- millorar la tolerància al dany per isquèmia/reperfusió induint preconditionament isquèmic, on les cèl·lules s'exposen a varis senyals d'estrès i generen l'activació de mecanismes de defensa contra el subsegüent dany.
- interferir en processos que estan associats amb el desenvolupament irreversible del dany cel·lular.

Entre aquestes estratègies, la inducció del preconditionament isquèmic, que es basa en aplicar temps curts d'isquèmia (10 minuts) seguit de reperfusiones de 10 minuts abans de generar una isquèmia més agressiva, o l'administració directa de mediadors com l'adenosina, ATP, NO i cardiotrofina, capaços de generar les respostes al preconditionament, han estat efectius en moltes condicions experimentals [181-184].

A més, varis estudis clínics han demostrat els beneficis del preconditionament isquèmic en processos de resecció i transplantament de fetge [185].

Per altra banda, la modulació farmacològica dels processos responsables del dany causat durant la reperfusió han estat també portats a terme utilitzant agents que redueixen i/o antagonitzen l'estrès oxidatiu, la permeabilitat mitocondrial transitòria, les senyals proapoptòtiques, els mediadors inflamatoris i les destorbances microcirculatories [134, 135, 142, 143].

Per exemple, hi ha varis estudis on s'observa que l'administració d'antioxidants com el GSH o precursors del GSH com podrien ser l'S-adenosil-metionina (SAM), N-acetil cisteïna o altres, també és una bona manera de mantenir el fetge protegit ja que disminueixen els radicals, ja sigui directament o conjuntament amb la GSH peroxidasa [144-146].

Estudis previs on s'han utilitzat ratolins deficients en el gen del TNF o en el receptor 1 de TNF (TNFR1) han identificat el TNF com a mediador crític en I/R



hepàtica en calent [45, 186, 187]. A més, s'han vist increments hepàtics en els nivells de ceramida en isquèmies en fred i reperfusions en calent [58] tot i que les conseqüències i la seva regulació no han estat del tot estudiades.

També s'ha descrit la regulació d'esfingomielinases en models d'I/R en rata, on s'ha vist una estimulació d'esfingomielinasa neutra durant la reperfusió en el fetge isquemic, oposadament a la regulació de l'esfingomielinasa àcida que disminueix [135]. Però el seu impacte en la regulació de la ceramida i la contribució en el dany per I/R no estava delimitat.



**OBJECTIUS**



## **OBJECTIUS**

Donat que s'ha observat que la generació de ceramida, en especial la generada per les esfingomielinases, contribueix al dany hepàtic induït per diferents estímuls proapoptòtics, entre ells el TNF [126, 130], els objectius del **primer estudi** són:

- Examinar la contribució del metabolisme esfingolipídic en el dany hepàtic per isquèmia/reperfusió.
- Valorar l'ús d'estratègies de modulació dels nivells de ceramida com a teràpies potencials per a la protecció front al dany hepàtic induït per I/R.
- Analitzar la participació de la ceramida en la senyalització de mort hepatocel·lular causada per I/R.

Donat que s'ha observat que les espècies reactives d'oxigen (ROS) poden interferir en l'activació d'NF-κB, i que els ROS juntament amb el TNF s'han descrit com a participants claus en el desenvolupament del dany causat per la I/R hepàtica, els objectius del **segon estudi** són:

- Analitzar els paràmetres relacionats amb l'estrès oxidatiu i la seva evolució durant la isquèmia.
- Examinar l'activació d'NF-κB i l'expressió dels gens protectors i inflamatoris κB-depenents en relació a la durada del temps d'isquèmia en diferents tipus cel·lulars hepàtics.
- Estudiar l'aplicabilitat d'estratègies que permetin diferenciar l'activació d'NF-κB en diferents tipus cel·lulars hepàtics i l'actuació sobre grups específics (protectors vs. inflamatoris) de gens depenents d'NF-κB en I/R.



# **MATERIALS I MÈTODES**





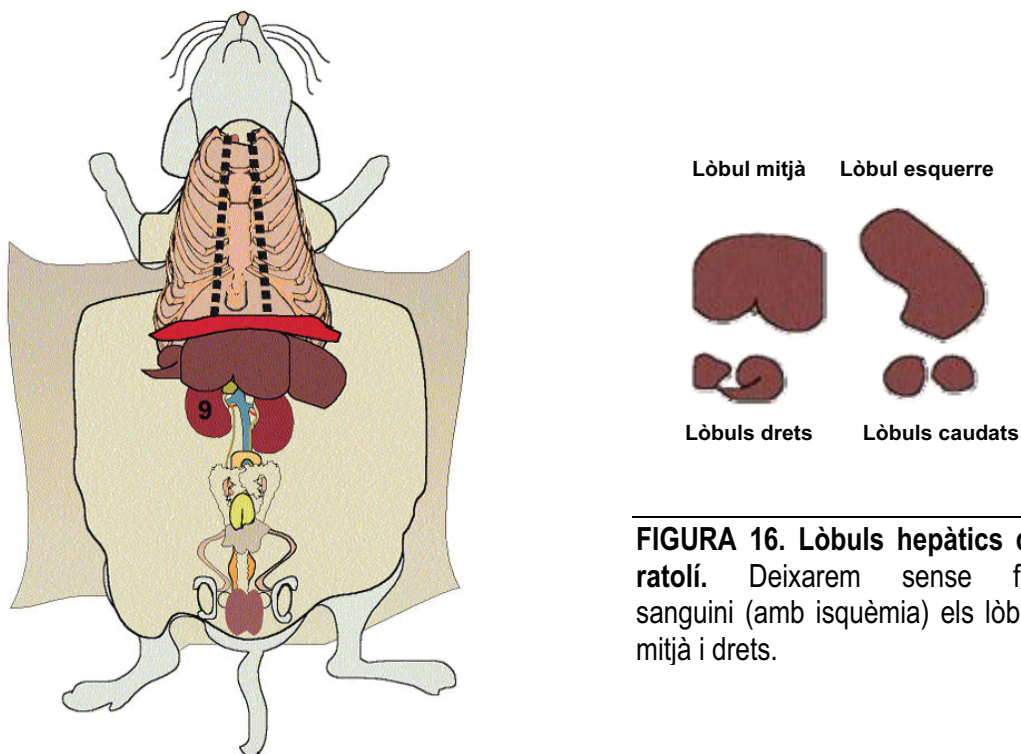
## 1. ISQUÈMIA PARCIAL HEPÀTICA

Per a l'avaluació morfològica i bioquímica del dany hepàtic, es va utilitzar un model d'isquèmia parcial en calent en ratolins mascles C57/BL6 (8-12 setmanes) durant 90 minuts. Es va induir l'anestèsia mitjançant la inhalació d'isofluorà al 2.5% i es va seguir amb el manteniment a l'1.5% d'isofluorà. Els animals van ser oberts realitzant un tall longitudinal per la línia mitja ventral. Es van separar les vísceres per a visualitzar la vena porta del fetge, i es va pinçar una de les bifurcacions que presenta, produint d'aquesta manera una isquèmia parcial del 70% del fetge. Es mantingueren, per tant, durant 90 minuts amb un "clip-BIEMER" (pinça) que aplica una força de 0.29-0.39N. En el segon estudi es van aplicar diferents temps d'isquèmia (0-120 minuts).

Un cop passa el temps d'isquèmia, es treu la pinça i es deixa que despertin.

En el moment en que es treu la pinça comença el temps de reperfusió.

Els animals van ser sacrificats a diferents temps per a veure els efectes produïts i analitzar tots els paràmetres.



**FIGURA 16. Lòbuls hepàtics del ratolí.** Deixarem sense flux sanguini (amb isquèmia) els lòbuls mitjà i drets.

## **2. ADMINISTRACIÓ DE FÀMACS**

En el primer estudi, 30 minuts abans de realitzar la isquèmia als ratolins, es van administrar intraperitonealment els següents fàrmacs:

- Imipramina (Sigma-Aldrich): 25 mg / kg
- NOE (Sigma-Aldrich): 100 mg / kg
- SP600125 (Calbiochem): 20 mg / kg

En el segon estudi, 1 hora abans de realitzar la isquèmia als ratolins, es van administrar intraperitonealment els següents fàrmacs:

- SAM (Sigma-Aldrich): 5 mg / ratolí
- BSO (Sigma-Aldrich): 4 mmol / kg
- MnTBAP (Calbiochem): 50 mg / kg

En alguns casos es va administrar clorur de gadolini 24 hores abans de provocar la isquèmia per a eliminar les cèl·lules de Kupffer [34, 188].

## **3. MESURA DELS NIVELLS DE TNF EN PLASMA**

S'obté la sang per punció cardíaca i es centrifuga a 12000 rpm durant 10 minuts. 50 µl de les alíquotes de plasma es congelen per a l'assaig de TNF.

Els nivells de TNF es varen determinar mitjançant un *kit* comercial d'assaig immunoabsorbent lligat a enzims (ELISA) (Quantikine M Murine Tumor Necrosis Factor-alpha Assay; R&D System)

## **4. DETERMINACIÓ DE TRANSAMINASES**

Els nivells sèrics d'aspartat i alanina aminotransferasa (AST, ALT) serveixen com a marcadors indicatius de dany hepàtic. Es determinen utilitzant un

analitzador bioquímic del Centre de Diagnòstic Mèdic (Hospital Clínic, Barcelona).

## **5. CULTIUS CEL·LULARS**

### **5.1. LÍNIES CEL·LULARS**

La línia cel·lular de cèl·lules d'hepatoma murines H1c1c7 es van obtenir de la Colecció Europea de Cultius de Cèl·lules Animals (ECACC) i es van fer créixer a 37°C amb un 5% CO<sub>2</sub> amb medi Dulecco modificat de Eagle (DMEM) sota una atmosfera de normòxia. El medi de cultiu es va complementar amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS) inactivat per calor i antibiòtics, penicil·lina (100 U / ml) i estreptomicina (100 µg / ml).

### **5.2. AÏLLAMENT D'HEPATÒCITS I CÈL·LULES DE KUPFFER**

El protocol d'aïllament d'hepatòcits i de cèl·lules no parenquimals (Kupffer) és comú, **excepte en l'últim pas**, on la centrifugació a baixes revolucions permet separar els hepatòcits de les cèl·lules no parenquimàtiques. Els hepatòcits, degut al seu major tamany, els trobarem en el sediment i les cèl·lules no parenquimals en el sobrenedant.

Aquesta tècnica està basada en l'eliminació del Ca<sup>2+</sup> per perfusió d'un agent quelant i posterior perfusió amb col·lagenasa. S'obté un alt rendiment en els hepatòcits aïllats, amb una viabilitat del 80%, d'aparença esfèrica i lliures de les cèl·lules no parenquimals.

#### **Solucions i tampons**

El tampó Hanks i la solució C es gasegen amb 95 % O<sub>2</sub> i 5 % CO<sub>2</sub> i es mantenen a 37°C.

##### **Tampó Hanks**

80 g NaCl

4 g KCl

2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

0.6 g  $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0.6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

pH: 7.4

(volum final: 1litre)

**Solució Hanks I**

200 ml de Hanks

1g BSA

0.6 mM EGTA

**Solució Hanks II**

100 ml de Hanks

25 mg col·lagenasa IV

4 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

**Solució C (Solució Krebs-Henseleit)**

6.9 g NaCl

0.36 g KCl

0.13 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0.295 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.374 g  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

2 g  $\text{NaHCO}_3$

pH: 7.4

(volum final: 1litre)

**Procediment quirúrgic**

Els ratolins C57/BL6 (25 g) s' anestesien amb pentobarbital sòdic al 5 % (0.1 ml per cada 100 g de pes corporal) i la cavitat peritoneal s'obre amb una incisió a la meitat del ventre. Es col·loca una lligadura (sense lligar) al voltant de la vena

cava inferior molt a prop del fetge i s'introdueix la cànula o catèter a la vena porta. S'assegura la cànula amb una lligadura.

La perfusió s'inicia amb 10 ml / min *in situ* amb la solució Hanks I al mateix temps que es talla la vena cava inferior, per sota d'on s'ha posat la lligadura. Per tal d'evitar la introducció de bombolles al fetge, es deixa gotejar la cànula abans d'introduir-la al fetge.

Després de 2 minuts de perfusió amb la solució de rentat Hanks I, es talla la vena cava superior i es lliga la vena cava inferior, i es recircula la solució Hanks II durant aproximadament 3 minuts fins que el fetge sembli inflat i pàl·lid. Seguidament, passem el fetge a una placa de petri amb la solució C i amb ajuda d'unes pinces i una pipeta pasteur es van extraient els hepatòcits.

Les cèl·lules es filtren a través d'una gasa i es centrifuguen a 50 g durant 4minuts.

Recollir:

-el sediment si volem els hepatòcits. (es renta amb solució C i es centrifuga de nou a 50 g durant 4 minuts).

-el sobrenedant si volem les cèl·lules no parenquimals

La viabilitat cel·lular es determina per exclusió amb Tripan Blue al 0.2 % en PBS en una càmera de Neubauer.

### **5.3. CULTIU PRIMARI D'HEPATÒCITS DE RATOLÍ**

$0.5 \times 10^6$  cèl·lules per pou es sembren en plaques de 6 pous que contenen una base de col·lagen (extret a partir de cua de rata). El medi utilitzat és DMEM: F12 (1:1) complementat amb un 10 % de sèrum fetal boví inactivat, 100 U / ml de penicil·lina, i 100 µg / ml d'estreptomicina.

Després de 3 hores de cultiu, es renten les cèl·lules amb medi sense sèrum fetal per tal d'eliminar les cèl·lules no viables, que no han quedat adherides i es procedeix als tractaments adequats.

#### **5.4. AÏLLAMENT I CULTIU DE CÈL·LULES DE KUPFFER**

Iniciem l'aïllament de les cèl·lules de Kupffer a partir de la fracció de cèl·lules no parenquimals aïllades segons el protocol explicat anteriorment (apartat 5.2).

##### **Reactius i Materials:**

- Percoll (Amersham).

##### **Procediment**

- Partim de la fracció de cèl·lules no parenquimals obtingudes segons el protocol de l'apartat 5.2 provinents de 3 ratolins.
- Després de la centrifugació a baixes revolucions (4 minuts a 50g), ens quedem amb el sobrenedant que és on es troben les cèl·lules no parenquimals (en el sediment trobem els hepatòcits).
- Centrifuguem a 700 g durant 10 minuts a 4°C.
- Decanem i diluïm el sediment (cel. no parenquimals) en 10 ml de PBS.
- Centrifuguem a 50 g 4 minuts.
- Recollim el sobrenedant i centrifuguem a 700 g 5 minuts.
- Resuspenem el pellet en 3.3 ml de PBS.
- Preparam un percoll: 50 % / 25 % en un tub de 15 ml.

##### ***Preparació del percoll:***

1. 5 ml de percoll al 50 % (fons del tub):
    - 2.5 percoll + 2.5 ml de PBS 1 %
  2. 6.6 ml de percoll al 25 %
    - 1.65 ml percoll + 4.95 ml PBS 1 %
  3. 3.3 ml del sediment diluït en PBS.
- Centrifugar a 800 g durant 25 minuts a temperatura ambient (utilitzar una centrífuga basculant).

- Recollir la interfase de percoll 25 % - 50 % (rica en cèl·lules de Kupffer i endotelials) i transferir-la a un tub de 15 ml.
- Afegir 15 ml de PBS i barrejar suaument.
- Centrifugar a 800 g durant 10 minuts a 4°C.
- Resuspendre les cèl·lules en medi DMEM amb un 10 % de sèrum fetal boví, 100 U / ml de penicil·lina, i 100 µg / ml d'estreptomicina.
- Plaquejar les cèl·lules en una placa de 6 pous i incubar a 37°C al 5 % de CO<sub>2</sub> i 95 % d'O<sub>2</sub> .
- Després de 45 minuts de cultiu, es renten les cèl·lules amb medi DMEM (complementat amb un 10 % de sèrum fetal boví) per tal d'eliminar les cèl·lules endotelials que encara no han quedat adherides. De manera, que les cèl·lules que ens queden a la placa són cèl·lules de Kupffer.
- Després de 2 hores de cultiu, es procedeix als tractaments adequats.

### **5.5. TRACTAMENTS CEL·LULARS**

Els hepatòcits primaris i les cèl·lules de Kupffer varen ser exposades a condicions de hipòxia (0.5% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub>), TNF (Peprotech EC) o LPS (Sigma-Aldrich) a diferents períodes.

## **6. TRANSFECCIÓ *IN VITRO* I TRACTAMENT *IN VIVO* D'ARNi**

El silenciament de proteïnes per ARN d'interferència consisteix en la utilització d'ARN de pocs parells de bases (*small interfering RNA* o ARNi) que hibrida específicament amb l'ARN missatger (ARNm) diana, i el producte de doble cadena resultant és degradat per ARNases cel·lulars. El resultat és una disminució en els nivells d'expressió de la proteïna desitjada.

La transfecció *in vitro* d'ARNi a cèl·lules d'hepatoma murines H1c1c7 es va realitzar amb la solució catiònica siPORTamina<sup>TM</sup> (Ambion) .

Es van fer tres construccions de diferents seqüències de l'ARNm de l'esfingomielinasa àcida (ASMasa) i es va verificar la capacitat de silenciament de l'esfingomielinasa àcida analitzant els nivells d'activitat enzimàtica i els nivells d'ARNm de l'ASMasa per PCR a temps real.

A més, també es va dissenyar un control negatiu d'ARNi, que no tenia homologia amb cap altre gen, utilitzant seqüències aleatòries de l'ARNi 1 de l'ASMasa, l'ARNi amb l'eficàcia més elevada per a silenciar l'ARNm de l'ASMasa.

Les tres seqüències d'ARNi per a l'ASMasa humana (Gene Bank TM z14252), es van identificar en tres posicions relatives del codó d'inici:

271-291 (AAAGTCTTATTCACTGCTCTC) ASMasa ARNi-1.

517-537 (AACATAGCACCCTAGATGTG) ASMasa ARNi-2.

1491-1511 (AATAGATGGAAACTACCCCGG) ASMasa ARNi-3.

Per als experiments *in vivo*, els ARNi sintetitzats químicament (Curevac) van ser administrats als ratolins per un mètode de transfecció hidrodinàmica, injectant intravenosament per cua 1 nmol de l'ARNi control o de l'ARNi de l'ASMasa en un 1 ml de PBS 24 i 78 hores abans de la cirurgia. Aquest mètode, que va ser provat efectivament per a silenciar les proteïnes *in vivo*, distribueix l'ARNi a la majoria de les cèl·lules parenquimals del ratolí (60-70 %).

Per tal de descartar la resposta a l'interferó dels animals tractats amb l'ARNi, es varen mesurar els nivells sèrics d'IL-12 després de la injecció de l'ARNi utilitzant un *kit* comercial d'ELISA (PeproTech EC).

Es va injectar també Poly I:C (Amersham, 2.5 mg / kg) com a control positiu per la inducció d'IL-12.



## **7. OBTENCIÓ D'HOMOGENAT DE FETGE TOTAL, CITOSÒLIC I MITOCONDRIAL**

Es van utilitzar trossos de fetge d'aproximadament 200 mg.

### **Tampó d'homogeneïtzació ("homobuffer")**

220 mM manitol

70 mM sacarosa

0.1 mM EDTA

3 mM Tris

0.1% BSA (f.a.f)

1:1000 ortovanadat sòdic

1 pastilla complete (Roche) per 20 ml d'homobuffer

### **Procediment**

Per mg de fetge, utilitzem 10 µl d'*homobuffer*.

- Homogeneïtzar 4 vegades amunt i avall a 1200 rpm.
- Centrifugar a 700 g durant 15 minuts de manera que precipiten els nuclis i teixits trencats. Aquesta serà la fracció total.
- Per obtenir la fracció citosòlica i precipitar mitocondris, es centrifuga de nou però a 10000 g durant 15 minuts. El sobrenedant serà la fracció citosòlica.
- Per a la obtenció dels mitocondris es renta el precipitat amb 1 ml d'homobuffer i es torna a centrifugar a 10000 g durant 15 minuts. Seguidament es resuspèn el precipitat amb 200 µl d'*homobuffer*. Sempre a 4°C.

## **8. OBTENCIÓ D'EXTRACTES NUCLEARS**

Els extractes nuclears es determinaren pel mètode de Mathias P [189].

### **Solucions i Tampons**

#### **Tampó A**

10 mM HEPES	2.38 g
10 mM KCl	0.74 g
0.1 mM EDTA	37 mg
0.1 mM EGTA	38 mg
H <sub>2</sub> O	1000 ml

pH: 7.9

#### **Tampó C**

20 mM HEPES	4.77 g
0.4 mM NaCl	23.4 g
1 mM EDTA	372 mg
1 mM EGTA	380 mg
H <sub>2</sub> O	1000 ml

pH: 7.9

**-ditiotreitòl (DTT) 1 M:** 15.4 mg / 100 µl H<sub>2</sub>O (preparar al moment)

**-Nonidet NP-40 10 %** en tampó A

#### **Tampó A / 1mM DTT / NONIDET 10%**

10 µl stock DTT

mitja pastilla complete (Roche)

400 µl NONIDET 10%

10 ml tampó A

**Tampó C / 1mM DTT**

10 µL stock DTT

1 pastilla complete (Roche)

10 ml tampó C

**Procediment**

- Resuspendre aproximadament 200 mg de fetge en 2 ml de tampó A i homogeneïtzar a 1200 rpm.
- Deixar uns minuts en gel i recuperar 1ml.
- Deixar-ho 15 minuts en gel.
- Centrifugar a 700 g 5 minuts a 4°C.
- Resuspendre el precipitat amb 500 µl de tampó A.
- Deixar-ho 15 minuts en gel.
- Centrifugar a 14000 rpm durant 30 segons.
- Resuspendre el precipitat amb 100 µl de tampó C.
- Deixar-ho 15 minuts en gel i anar vortejant.
- Centrifugar a 14000 rpm 5 minuts a 4°C.
- Recuperar el sobrenedant que conté les proteïnes nuclears.
- Guardar-ho lo més ràpid possible a -80°C.
- Utilitzar una alíquota de 50 µl per a mesurar les proteïnes nuclears.

**9. VALORACIÓ DE PROTEÏNES**

Per a la valoració de proteïnes de les mostres s'ha utilitzat el mètode colorimètric de Bradford. El reactiu de Bradford reacciona amb els residus aromàtics de les proteïnes per formar un complex colorejat i en la quantificació del qual es basa el mètode. Es determina l'absorbància a 595 nm de diferents

mostres i es calcula la concentració respecte a un estàndard de concentració coneguda.

### **Solucions i Reactius**

- BSA 1 mg / ml
- Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, 500-0006): diluir el comercial a 1:4 i filtrar amb paper de filtre

### **Procediment**

#### **1. estàndards**

- 500 µl BSA 1 mg / ml + 500 ml H<sub>2</sub>O = 0.5 µg/µl
  - 400 µl BSA 1 mg / ml + 600 ml H<sub>2</sub>O = 0.4 µg/µl
  - 300 µl BSA 1 mg / ml + 700 ml H<sub>2</sub>O = 0.3 µg/µl
  - 200 µl BSA 1 mg / ml + 800 m H<sub>2</sub>O = 0.2 µg/µl
  - 100 µl BSA 1 mg / ml + 900 ml H<sub>2</sub>O = 0.1 µg/µl
  - 0 µl BSA 1 mg / ml + 500 ml H<sub>2</sub>O = 0 µg/µl
2. A 20 µl de estàndard, afegir 1 ml Bio-Rad. Fer un blanc amb 20 µl d'H<sub>2</sub>O.
  3. Posar de 5 a 25 µl de cada mostra i afegir 1 ml de Bio-Rad.
  4. Incubar a temperatura ambient de 20 a 60 minuts.
  5. Llegir a 595 nm, llegint prèviament el blanc.
  6. Obtenim la recta patró amb els estàndards i d'ella extrapolem la concentració de les mostres.

## **10. DETERMINACIÓ DE PROTEÏNES**

### **10.1. ELECTROFORESI EN GEL D'SDS-POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)**

La utilització d'aquest mètode ens permet separar proteïnes en base a la seva mobilitat electroforètica. L'SDS (dodecil sulfat de sodi), un detergent aniònic,

envolta les proteïnes conferint una càrrega negativa proporcional a la seva mida. La longitud de la molècula, que és proporcional a la massa, determina la separació de les proteïnes durant l'electroforesi en els gels de poliacrilamida, les quals migren en el gel a una velocitat inversament proporcional al logaritme del seu pes molecular. Dins d'un camp elèctric, les proteïnes migren cap al pol positiu (ànode) a través d'una matriu porosa constituïda bàsicament de polímers d'acrilamida.

### **Solucions i tampons**

#### **Solució 1**

0.75 M Tris-HCl pH: 8.8

0.2 % SDS

#### **Solució 2**

30 % acrilamida

0.8 % Bis-acrilamida

#### **Tampó d'electroforesi**

28.82 g Glicina

6.6 g Tris

2 g SDS

Aigua mQ fins a 2 L

### **Procediment**

#### **1. Gel resolutiu.**

El gel resolutiu es compon de: solució 1, solució 2, aigua, temed i persulfat amònic (PSA) 13 %.

És el primer que es prepara, el TEMED i el PSA s'afegeixen en aquest ordre i al final ja que són els que inicien la polimerització.

La quantitat de cada un dels components dependrà de la mida de les proteïnes que vulguem utilitzar. Un percentatge baix d'acrilamida afavorirà la separació de proteïnes d'alt pes molecular, mentre que un

percentatge alt afavorirà la separació de proteïnes de baix pes molecular.

### **2. Gel empaquetador o “stacking”.**

Amb els mateixos components del gel resolutiu, s'afegeix a sobre i serveix per a empaquetar les proteïnes. El percentatge d'acrilamida d'aquest gel és sempre baix per permetre el pas de les proteïnes de totes les mides.

3. Les proteïnes es dilueixen amb el tampó de mostra (loading buffer, SIGMA) i un agent reductor com el DTT o 2- $\beta$ -mecaptoetanol en una proporció 3:1 respectivament i es bullen 2 minuts, provocant la seva desnaturalització.

4. Es carreguen les mostres i es connecta l'aparell a la font de voltatge inicialment a 80 V en el gel empaquetador i a 125 V en el gel resolutiu.

## **10.2.WESTERN-BLOT**

Aquesta tècnica consisteix en la detecció indirecta de proteïnes sobre una membrana de nitrocel·lulosa obtinguda per transferència d'un gel de poliacrilamida i utilitzant anticossos contra les proteïnes. El complex antien-anticòs format pot ser detectat gràcies a un segon anticòs unit a l'enzim peroxidasa que reacciona amb el seu substrat produint una reacció quimioluminiscent.

### **Solucions i tampons**

#### **Tampó de transferència**

25 mM Tris-HCL

128 mM Glicina

0.1 % SDS

20 % metanol

pH: 8.3

**Tampó TBS**

20 mM Tris-HCL

150 mM NaCl

pH: 7.4

**Tampó TBST**

Tampó TBS + 0.05 % de Tween 20

**Solució de bloqueig**

8 % de llet en pols desnatada amb TBST

I en altres casos, 8% BSA (f.a.f)

**Solució d'ECL**

Reactiu d'ECL (Amersham)

**Procediment**

Un cop les proteïnes s'han separat en el gel de poliacrilamida:

- Es transfereixen a una membrana de nitrocel·lulosa (Hibond ECL, Amersham).
- Es munta el sistema de transferència (Bio-Rad) i es transfereix a 4 °C i 100 V durant 1 hora.
- Es bloqueja d'1-3 hores amb llet en pols o BSA.
- S'incuba l'anticòs primari 2 hores a temperatura ambient o tota la nit a 4°C.
- Es fan tres rentats de deu minuts amb TBST.
- S'incuba l'anticòs secundari durant 45 minuts a temperatura ambient.
- Es fan tres rentats de deu minuts amb TBST.
- Revelat amb quimioluminiscència amb anticossos secundaris peroxidasa: s'incuba la membrana durant 1 minut amb el reactiu ECL i es posa en contacte amb un film d'auto radiografia el temps necessari. Un cop exposat, el film es revela.

### **Anticossos utilitzats**

La sortida mitocondrial de proteïnes va ser monitoritzada per western blot de la fracció citosòlica utilitzant els següents anticossos:

- Anti-citocrom c monoclonal de ratolí (clon 7H8.2C12, 1:2000, Pharmigen)
- Anti-Smac/DIABLO policlonal de conill (1:1000, Calbiochem)

La fosforilació de JNK i d'AKT es va analitzar en extractes totals utilitzant els següents anticossos:

- Anti-Phospho JUN-kinase policlonal de conill (1:1000, Cell signaling)
- Anti-JUN-kinase monoclonal de conill (1:2500, Cell Signaling)
- Anti-Phospho AKT policlonal de conill (1:250, Santa Cruz)
- Anti-AKT policlonal de conill (1:250, Santa Cruz)

La fosforilació de c-Src va ser analitzar en homogenats totals de fetge utilitzant els següents anticossos:

- Anti-Phospho-Src (tyr416) policlonal de conill (1:1000, Cell Signalling)
- Anti-Src monoclonal de ratolí (1:1000, Santa Cruz)

Les fraccions mitocondrials, obtingudes com s'ha indicat prèviament, es varen utilitzar per a analitzar els nivells de Bim i fosfo-Bim:

- Anti-Phospho-Bim policlonal de conill (1:1000, Santa Cruz)
- Anti-Bim policlonal de conill (1:2000, Santa Cruz)
- Anti-citocrom c oxidasa policlonal de cabra (1:250, Santa Cruz)

L'activació de NF- $\kappa$ B es va analitzar en extractes nuclears utilitzant el següent anticòs:

- anti-p65 policlonal de cabra (1:250, Santa Cruz)

### **10.3. IMMUNOPRECIPITACIÓ**

Per a avaluar la fosforilació en tirosina d'I $\kappa$ B- $\alpha$  després de la I/R, es va immunoprecipitar 1 mg del lisat de fetge utilitzant 2  $\mu$ g de l'anticòs policlonal



anti-IkB- $\alpha$  (Santa Cruz) i es va determinar la fosforilació amb l'anticòs monoclonal de ratolí anti-fosotirosina (1:1000, Santa Cruz).

Per a dur a terme la immunoprecipitació, s'utilitzen boles de proteïna G-agarosa (Santa Cruz Biothecnology).

#### **Tampó RIPA**

50 mM Tris – HCl; pH: 7.8

150 mM NaCl

0.25 % Na-deoxycholate

1 % igepal

1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

1 mM EDTA

#### **Procediment**

- Incubar 1 mg de proteïna de l'homogenat de fetge amb 2 ml de tampó Ripa i 2  $\mu$ g de l'anticòs IkB- $\alpha$  durant 1h a 4°C.
- Afegir a les mostres 50  $\mu$ l de boles de proteïna G-agarosa i deixar-ho agitant a la nòria tota la nit a 4°C.
- Centrifugar a 14000 rpm durant 5 segons.
- Rentar el precipitat tres cops amb tampó RIPA.
- Realitzar l'immunoblot com es descriu a l'apartat anterior.
- Bloquejar la membrana amb 5% BSA durant 1 hora a temperatura ambient.
- Incubar amb l'anticòs monoclonal de ratolí anti-fosfotirosina.

#### **10.4. ELIMINACIÓ D'ANTICOSSOS DE LA MEMBRANA “STRIPPING”**

L'anticòs secundari i primari poden ser eliminats de la membrana per a un segon marcatge de la mateixa membrana.

**Reactiu**

- solució d' "Stripping" (Restore™ Western Blot Stripping Buffer, Thermo scientific)

**Procediment**

- Submergir la membrana en la solució d' "Stripping" i deixar-la agitant durant 10 minuts.
- Rentar la membrana un parell de cops 5 minuts cada cop, amb TBST 1X, agitant-la suaument.
- Bloquejar la membrana i continuar amb el protocol de detecció.

## **11. DETERMINACIÓ DE CASPASA 3**

Els extractes citosòlics s'incuben amb el substrat específic de la caspasa-3, Av-DEVD-AMC (Calbiochem), i el producte que es forma (7-amino-4-trifluorometil coumarin) emet fluorescència [190].

**Tampó d'incubació**

10 % sacarosa

0.1 % CHAPS

100 mM NaCl

10 mM DTT

pH: 7.5

**Procediment**

- S'incuben 500 µg de proteïna de l'homogenat citosòlic amb 500 µl de buffer d'incubació i 40 nmols del substrat de la caspasa-3 (ac-DEVD-AMC).
- La barreja es deixa durant 15-30 minuts a 37 °C i es monotoritza la fluorescència de manera contínua, mesurant l'emissió a 460 nm amb excitació a 380 nm en el fluorímetre.

## **12. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT**

### **ESFINGOMIELINASA**

L'activitat esfingomielinasa es determina utilitzant esfingomielina N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino (SM-NBD) segons el mètode descrit per Quintern LE i Dandhoff K [191].

#### **12.1. ESFINGOMIELINASA NEUTRA**

Per mesurar l'activitat de l'*esfingomielinasa neutra* (NSMasa), 125 µg de proteïna de l'homogenat total s'incuben a 37°C durant 2 hores en el següent tampó:

20 mM Hepes

0.1 % Tritó X-100

1 mM MgCl<sub>2</sub>

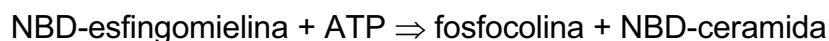
10 µM SMN-NBD

pH: 7.4

(volum final 250 µl)

La reacció és lineal en aquest marge de concentració i la quantitat d'esfingomielina-NBD hidrolitzada no excedeix el 10%.

La reacció que té lloc és:



El producte, NBD-ceramida, s'extreu amb 750 µl de cloroform: metanol (2:1, v/v). Increments en NBD-ceramida es determinen per cromatografia de capa fina (TLC) utilitzant una solució amb cloroform, metanol i diòxid d'amoni 20% (70:30:5, v/v).

## **12.2. ESFINGOMIELINASA ÀCIDA**

Per la determinació de l'activitat *esfingomielinasa àcida* (ASMasa), partim de 75 µg de proteïna de l'homogenat total i incubem 2 hores a 37°C en una solució que conté:

250 mM acetat sòdic

0.1 % Tritó X-100

10 µM SMN-NBD

pH 5.0

(volum final 250 µl)

A continuació, la quantitat d'NBD-ceramida produïda es quantifica de la mateixa manera descrita per la NSMasa.

## **13. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT CERAMIDASA**

L'activitat ceramidasa es va realitzar utilitzant ceramida C12-NBD [192] .

### **13.1. CERAMIDASA NEUTRA**

Per la determinació de l'activitat *ceramidasa neutra* (NCDasa), 100 µg de proteïna de l'extracte total s'incuben a 37 °C durant una hora amb el següent tampó:

5 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM Tris

0.2 % Tritó X-100

10 µM Ceramida C<sub>12</sub>-NBD

pH: 7.4

(volum final 300 µl)

La reacció que té lloc és:



El producte, àcid gras (NBD-dodecanoic) que equival a la quantitat d'esfingosina generada en la reacció, s'extreu amb 900 µl de cloroform: metanol (2:1, v/v). Increments en NBD-ceramida, es determinen per cromatografia de capa fina (TLC) utilitzant una solució de cloroform, metanol i hidròxid d'amoni 20% (70:30:5, v/v).

### **13.2. CERAMIDASA ÀCIDA**

Per la determinació de l'activitat *ceramidasa àcida* (ACDasa), 100µg de proteïna de l'extracte total s'incuben a 37°C durant una hora amb el següent tampó:

500mM NaCl

0.2% Tritó X-100

10 µM Ceramida C<sub>12</sub>-NBD

pH: 4.5

(volum final 300 µl)

A continuació, la quantitat d'NBD-dodecanoic produït es quantifica de la mateixa manera descrita per la NSMasa.

## **14. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT GLUCOSIL CERAMIDA SINTASA**

Per la determinació de l'activitat *glucosil-ceramida sintasa* (GCS) [193], 200 µg de proteïna de l'extracte total s'incuben a 37 °C durant una hora amb el següent tampó:

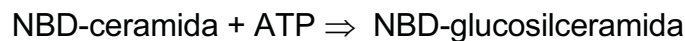
5 mM MgCl<sub>2</sub>

5 mM MnCl<sub>2</sub>

2.5 mM NADH

2 mM EDTA  
1 mM UDP-glucosa  
0.3 % BSA fatty acid free  
15  $\mu$ M NBD-ceramida  
pH:7.5  
(volum final 250  $\mu$ l)

La reacció que té lloc és:



La NBD-glucosilceramida generada, s'extreu amb 750  $\mu$ l de cloroform: metanol (2:1, v/v). Increments en NBD-glucosilceramida, es determinen per cromatografia de capa fina (TLC) utilitzant una solució de cloroform, metanol i hidròxid d'amoni 20% (70:30:5, v/v).

## **15. DETERMINACIÓ DE LA CERAMIDA ENDÒGENA**

Els nivells de ceramida en fetge es varen determinar mitjançant la reacció de la diacilglicerol cinasa (DGK) [26].

Aquest enzim fosforila específicament al lípid diacilglicerol (DAG), però també té com a substrat a la ceramida (encara que amb millor afinitat). La reacció catalitzada per la DGK és la següent:



Per a poder determinar la fosforilació de la ceramida, primer hem d'eliminar el DAG contingut en l'extracte lipídic; de manera que realitzarem una extracció dels lípids totals seguit d'una hidròlisi alcalina amb hidròxid potàssic en metanol (0.1 M KOH/ MeOH) amb la que eliminarem el DAG present i finalment passarem a la reacció *in vitro* amb l'enzim DGK (utilitzant ATP marcat en posició gamma) i a la detecció de ceramida mitjançant cromatografia de capa fina i autoradiografia.

**Extracció lipídica**

250 µg de proteïna els portarem a 500 µl amb *homobuffer* i farem l'extracció de la fase orgànica amb 1500 µl de cloroform:metanol (2:1, v/v). Secarem la fase orgànica a l'*speed-vac* i seguidament farem una hidròlisi alcalina.

**Hidròlisi alcalina**

S'incuba el producte durant 1 hora a 37 °C amb amb 250 µl de metanol/KOH 0.1M, 250 µl PBS, 500 µl cloroform.

Després d'una hora d'incubació, es vorteja la mostra i es centrifuga durant 5 minuts a 5000 rpm. Després de centrifugar, s'observaran dues fases; es transfereix la fase inferior (orgànica) a un nou tub (de borosilicat) i es deixa secar sota N<sub>2</sub> (10-12 min). S'obtindrà una fina pel·lícula en el fons del tub que conté els lípids; en aquest punt els lípids es poden guardar a -20°C durant varis dies.

**Assaig de la diacilglicerol cinasa (DGK)**

- En un tub de borosilicat barregem el següent (per a cada una de les mostres lipídiques):

6 µl de cardiolipina (25 mg/ml)

20 µl de DETAPAC (àcid dietilaminopentacètic) 1 mM

6.2 µl de octil-β-D-glucopiranòsid 825 mM

50 µl de solució de reacció:           100 mM NaCl

100 mM imidazol

2 mM EDTA

25 mM MgCl<sub>2</sub> pH 6.5

8 µl imidazol/DETAPAC (10 mM/1mM)

2 µl ATP 110 mM

8.3 µl H<sub>2</sub>O

3.5 µl DGK (1 mg/ml)

1µl γ<sup>32</sup>-P-ATP (3000 Ci/mmol)

- Afegir 100 µl d'aquesta barreja a cada tub que contingui l'extracte lipídic sec sota N<sub>2</sub>.
- Incubar 30 min a 25°C.
- Per a la reacció amb 1 ml de Kill, 270 µl de BSS i 30 µl d'EDTA 100 mM.
- Vortejar.
- Centrifugar 5 min.

### **Resolució de Ceramida-1-fosfat**

- Transferir 500/550 µl de la fase orgànica (inferior).
- Assecar sota nitrogen i dissoldre el residu lipídic en 50 µl de CHCl<sub>3</sub> : MeOH (1:1).
- Carregar 40 µl en una placa per a cromatografia de capa fina a una distància mínima d'1 cm del final de la placa.  
  
La fase mòbil es compon de CHCl<sub>3</sub> : MeOH : Àcid acètic (65:15:5, v/v/v).
- Es deixarà córrer la capa fina fins que el front estigui a 1-2 cm de la part superior de la placa.
- Es deixa assecar i s'exposarà a una pel·lícula fotogràfica de 3 a 24 hores.

La reacció de la DGK és lineal des de 20 a 1000 pmols de ceramida. Per a una quantificació de la quantitat de ceramida es necessitarà introduir simultàniament varis estàndards de ceramida al mateix temps (en els passos d'hidròlisi alcalina, assaig DGK i resolució de ceramida 1-P).

Es recomana una corba d'estàndards amb les següents concentracions de ceramida: 50, 100, 200, 400, 750 i 1500 pmols de ceramida; també s'aconsella utilitzar com a estàndard la ceramida tipus III de Sigma que està formada per una barreja de ceramides naturals.



## **16. DETERMINACIÓ DE GANGLIÒSIDS**

Els nivells de gangliòsids es van mesurar en els trossos de fetge per cromatografia en capa fina d'alta resolució (HPTLC) [123].

### **Procediment**

- Homogeneïtzar 150-200 mg de fetge amb aigua mQ (1 mg fetge : 4 µl aigua mQ) a 1200 rpm.
- Lisar les cèl·lules amb metanol/cloroform (3:2, v/v).
- Barrejar vigorosament.
- Centrifugar a 1000 g 5 minuts.
- Recollir el sobrenedant i liofilitzar-lo.
- Resuspendre el precipitat en disopropil èter/1-butanol de sodi 50 mM (3:2:0.5).
- Centrifugar a 2000 g 10 minuts.
- Recuperar el sobrenedant i liofilitzar-lo.
- Dissoldre les mostres en metanol/aigua (1:1 v/v) i carregar en una columna Sep-Pak C18 (prèviament rentada amb metanol, metanol/cloroform (1:1 v/v), metanol/aigua (1:1 v/v)).
- Eluir les mostres de la columna amb metanol, metanol/cloroform (1:1 v/v)
- Liofilitzar les mostres.
- Diluir les mostres amb metanol/cloroform (1:1).
- Aplicar en una placa de sílice de 60 A (Merk) que corre per capil·laritat amb tampó cloroform/metanol/aigua (50:42:11).
- Deixar assecar la placa.
- Tenyir amb *Resorcinol reagent* (1.5% resorcinol , 0.3 ml de sulfat cúpric, àcid clorhídric 37% y 50 ml d'aigua).
- Revelar per calor (180°C durant 15 minuts).

## **17. ASSAIG TUNEL I IMMUNOHISTOQUÍMICA**

S'obtingueren els trossos de fetge i es van deixar durant 24h amb formalina. Seguidament es varen parafinar i es varen fer talls de 5 µm de gruix amb un micròton, que després vàrem fixar sobre porta-objectes de vidre.

La tècnica TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end-labeling) ens permet detectar apoptosi mitjançant la tècnica enzimàtica de marcatge *in situ* dels fragments d'ADN tallats que es generen durant l'apoptosi. L'ADN polimerasa així com la deoxynucleotidyl transferasa (TdT) són utilitzats per introduir nucleòtids marcats en l'ADN parcialment degradat.

L'assaig TUNEL el duem a terme mitjançant la incubació amb proteïnasa K, 2 µg per ml de tampó Tris-HCl, 5 mM EDTA, ajustant a pH 7.4; les seccions es van marcar seguint les instruccions precises del *kit* comercial (*In Situ Cell Death Detection Kit*, Roche).

Les tincions immunohistoquímiques de caspasa-3 i de mieloperoxidasa [194] es realitzaren utilitzant un anticòs monoclonal de conill anti-caspasa-3 activa (BD Pharmigen) amb una dilució 1:200, i un anticòs policlonal de conill anti-mieloperoxidasa (Abcam) 0.1 mg/ml respectivament, seguint les instruccions indicades per la casa comercial BD. Pharmigen.

Ambdós es varen tenyir amb 3,3'-diaminobenzidina (RocheDiagnostics), i es varen contratenyir amb hematoxilina.

Les seccions es van examinar amb un microscopi Zeiss Axioplan equipat amb una càmera digital Nikon DXM1200F.

## **18. TINCIONS HEMATOXILINA/EOSSINA**

La tinció amb hematoxilina-eosina és una tinció doble basada en l'afinitat de les estructures per un o altre colorant. L'hematoxilina, colorant bàsic extret de *Celsapina campechiana*, tenyeix de color blavós les estructures

predominantment àcides com ara el nucli cel·lular. En canvi, l'eosina és una tetrabromofluoresceïna de caràcter àcid i basòfila que tenyeix el citoplasma de la cèl·lula d'un color rosat.

### **Reactius**

- Hematoxilina (Sigma)
- Eosina (sigma)
- Etanol absolut (AA), etanol 90% (A90) i etanol 70% (A70)
- Xilè
- Medi de muntatge (DPX) (Panreac)
- HCl-Etanol absolut 96%: 192 ml etanol absolut + 4 ml HCl
- Aigua amoniacal: 200 ml aigua destilada amb 3-4 gotes d'amoniac

### **Procediment**

- Desparafinar les mostres en xilè per tal d'afavorir que els colorants penetrin millor a la mostra (dos incubacions de 8 minuts cadascuna).
- Hidratar seguidament amb uns sèrie de gradients decreixents d'alcohol (AA, A90, A70) de 5 minuts cadascuna.
- Incubar 5 minuts en aigua destil·lada.
- Submergir les mostres en hematoxilina durant 4 minuts.
- Rentar amb aigua corrent.
- Submergir varies vegades amb HCl-Et 96% fins que apareixi un color vermellós.
- Submergir varies vegades amb aigua amoniacal fins que aparegui un color blavós.
- Rentar amb aigua corrent 2 minuts.
- Submergir amb aigua destil·lada 2 minuts.
- Submergir amb eosina entre un i cinc minuts segons la intensitat desitjada.

- Deshidratar les mostres un minut amb cada etanol, passant de l'etanol 70 a l'absolut.
- Deixar-ho 5 minuts en xilol.
- Realitzar el muntatge amb DPX i deixar-ho assecar durant 24 hores.

## **19. MDA. MESURA DE LA PEROXIDACIÓ LIPÍDICA**

La peroxidació lipídica en mostres de fetge es va determinar seguint la producció de malondialdehid (MDA) utilitzant el mètode de l'àcid tiobarbitúric (TBA) [195].

### **Reactius**

0.6% TBA (Sigma)

Acid ortofosfòric 1%

1-Butanol

### **Procediment**

- Afegir a 100µl de l'homogenat de fetge 2.4 ml de TBA i 1.2 ml d'àcid ortofosfòric 1%.
- Deixar-ho bullir durant 45 minuts.
- Deixar-ho refredar-
- Afegir 1.6 ml d'1-butanol.
- Barrejar les mostres.
- Centrifugar a 1200 rpm durant 10 minuts.

La concentració d'MDA es determina en els sobrenedants mesurant a l'espectre a una densitat òptica de 535 nm utilitzant una corba calibrada amb estàndards de TBA.

## **20. ASSAIG MIELOPEROXIDASA**

La mieloperoxidasa (MPO) és un enzim present a l'interior dels grànuls primaris dels neutròfils, i en menys quantitat en monòcits i macròfags [196]. La quantitat d'activitat MPO s'utilitza com un índex d'acumulació de neutròfils al fetge.

### **Solucions i tampons**

#### **Solució o-dianisidina**

43.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

6.5 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$

10 mM EDTA

0.016% o-dianisidina

0.001%  $\text{H}_2\text{O}_2$

pH: 6

#### **Solució HTAB**

43.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

6.5 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$

10 mM EDTA

50 mM HTAB

pH: 6

### **Procediment**

- Homogeneïtzar 200 mg de fetge en la solució HTAB.
- Centrifugar a 10.000 rpm 10 minuts.
- Incubar 100  $\mu\text{l}$  del sobrenedant amb 900  $\mu\text{l}$  de la solució o-dianisidina.
- Detectar el cromòfor estable que forma l'o-dianisidina oxidada mesurant a l'espectre de manera contínua durant 2 minuts amb l'absorbància a 460 nm.

En paral·lel, la tinció de mieloperoxidasa en les mostres de fetge es va determinar per immunohistoquímica com s'ha descrit anteriorment.

## **21. DETECCIÓ D'ESPÈCIES REACTIVES D'OXIGEN (ROS)**

Aquest mètode permet la detecció d'espècies reactives d'oxigen mitjançant la sonda 2',7'-diclorofluoresceïna (DCF). Aquesta es converteix en un producte fluorescent degut a l'oxidació amb peròxids [71].

### **Reactius**

5  $\mu$ M 2',7'-diclorofluoresceïna

### **Procediment**

- |                           |                                 |
|---------------------------|---------------------------------|
| 1. afegir a la cubeta:    | 90 ml de PBS 1X (pH 7.4)        |
|                           | 10 $\mu$ l d'homogenat de fetge |
|                           | 900 $\mu$ l DCFDA 5 $\mu$ M     |
|                           | incubar a 37 °C durant 30'      |
| 2. condicions de lectura: | Excitació: 485 nm               |
|                           | Emissió: 530 nm                 |
|                           | Fluorímetre (HITACHI, F-4500)   |

## **22. GSH y GSSG per HPLC**

Les concentracions de glutatió reduït (GSH) i oxidat (GSSG) es van determinar per cromatografia líquida d'altra resolució [197].

límit de sensibilitat: GSH:	1 nmol / mg prot
GSSG:	0.5 nmol / mg prot

HPLC (Gilson)

**Solucions i tampons**

àcid iodoacètic (IAA) 100 mM: 185.9 mg IAA  
1 ml m-cresol 2 mM (8.1 mg /10 ml)  
fins 10 ml H<sub>2</sub>O

KOH 10 M (stock): 5.61 g / 10 ml H<sub>2</sub>O

KHCO<sub>3</sub> 3M (stock): 3.00 g / 10 ml H<sub>2</sub>O

KOH 2M / KHCO<sub>3</sub> 2.4M (1V KOH 10 M : 4V KHCO<sub>3</sub> 3M)

dinitrofluorobenzè (DNFB): 75 µl / 5 ml etanol absolut  
preparar fresc. Protegir de la llum.

àcid tricloroacètic (TCA) 10%

acetat Na 2.6 M: 1 kg acetat Na  
448 ml H<sub>2</sub>O  
1.39 L àc.acètic glacial

Estàndars:

GSH 1mM (stock): 15.36 mg / 50 ml Krebs

GSSG 1mM (stock): 30.63 mg / 50 ml Krebs

Cisteïna 10 mM + 1 mM DTT: 60.6 mg + 7.7 mg / 50 ml Krebs

preparar fresc

diluir a 100 mM i derivatitzar

**Procés de derivatització**

- 100 µl mostra (homogenat) + 500 µl TCA 5%.
- Centrifugar 2-3 minuts a 14.000 rpm i recuperar el sobrenedant.
- Afegir 100 µl IAA.
- Vortejar.
- Afegir 75-150 µl KOH-KHCO<sub>3</sub> fins a assolir un pH: 8.5-9.

- Incubar a temperatura ambient durant 15-30 minuts a la foscor.
- Vortejar.
- Afegir 500 µl DNFB.
- Vortejar.
- Aferir 50 µl KOH-KHCO<sub>3</sub>.

Fins a pH > 9

- Deixar-ho o/n 4°C.
- Centrifugar 10 minuts a 14.000 rpm i recuperar el sobrenedant.

### **Condicions de l'HPLC:**

Fase mòbil:

tampó A: metanol 80%

tampó B: metanol 80 % / acetat Na 2.6 M 20%

Elusió en gradient

1. rentats: flux 0.1-0.5 ml metanol / min.
2. lectura: flux de 1.5 ml / min; longitud d'ona: 350 nm.
3. llegir primer un metanol com a línia de base.

## **23. MESURA DE GSH TOTAL PER ESPECTOFOTOMETRIA**

Els nivells de glutatió total també es van mesurar després d'una extracció amb 10 % d'àcid tricloroacètic [198] El mètode es basa en la reducció l'àcid ditiobis(2-nitrobenzoic) o DTNB pel grup tiol del GSH, donant lloc a un compost de color groc.

### **Reactius i Tampons**

- Glutatió reductasa (GR)



### **Tampó de treball**

9mM EDTA

0.1mM DTNB

0.15mM NADPH

50mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

### **Procediment**

- Afegir 2.3 ml de tampó de treball a 100 µl mostra.
- Afegir seguidament 100 µl de GR.
- La lectura a l'espectrofotòmetre es realitza a 37°C i una longitud d'ona de 412 nm. Al comparar amb els valors d'absorbància de les solucions estàndard de GSH (0-60 µM), obtenim la concentració de GSH total en les diferents mostres.

## **24. EXTRACCIÓ I ANÀLISIS D'ARN**

### **24.1. EXTRACCIÓ**

L'ARN total tant de les cèl·lules en cultiu, com de teixits hepàtics, es va extreure mitjançant TRizol Reagent (Life Technologies Ltd) [199].

### **Procediment**

Cèl·lules en cultiu:

1. Aproximadament 10x10<sup>6</sup> de cèl·lules es van lissar amb 1 ml de TRizol durant 5 minuts per a permetre la dissociació dels complexos nucleoproteics.

Teixits hepàtics:

- 1a.** Deixar trossets de fetge d'aproximadament 25mg amb 200 µl de TRizol durant 5 minuts a temperatura ambient.
- 1b.** Homogeneïtzar amb un èmbol estèril.
- 1c.** Afegir 500 µl de TRizol i barrejar per inversió.

2. Afegir 200µl de cloroform i agitar per inversió durant 15 segons per a assegurar una bona mescla de les diferents solucions.
3. Deixar-ho 3 minuts a temperatura ambient.
4. Centrifugar a 12000 g a 4°C durant 15 minuts.
5. Recuperar la fase superior.
6. Precipitar l'ARN amb 0.5 ml d'isopropanol.
7. Deixar-ho 10 minuts a temperatura ambient.
8. Centrifugar a 12000 g a 4°C durant 10 minuts.
9. Rentar el precipitat obtingut amb etanol 70%.
10. Deixar-ho a -20°C durant 30 minuts com a mínim.
11. Centrifugar a 12000 g a 4°C durant 5 minuts.
12. Resuspendre l'ARN amb 50-100 µl destil·lada, estèril i autoclavada.

La concentració i la puresa de l'ARN es va determinar mesurant l'absorbància a 260 nm i 280 nm en un espectofotòmetre (DU 640 Spectrophotometer, Beckman, USA). Una solució d'ARN que tingui  $DO_{260}=1$  conté aproximadament 40 µg d'ARN per ml. El quocient entre les absorbàncies a 260 i 280 nm ens dóna una mesura de la puresa de l'ARN. Una puresa òptima correspon a un quocient  $DO_{260}/DO_{280} = 1.7-2.0$ .

## **24.2. RT-PCR**

Per a posar a punt les condicions per la RT-PCR quantitativa a temps real, primerament vàrem realitzar RT-PCRs provant diferents temperatures d'anidament dels cebadors per a cada un dels ARNm que volíem determinar. Vàrem utilitzar un *kit* comercial de la casa Promega *Acces RT-PCR System*<sup>TM</sup>, seguint les especificacions exactes del fabricant. Els productes de la PCR i els marcadors es van resoldre mitjançant l'electroforesi d'un gel d'agarosa al 12% amb bromur d'etidi (0.5 µg/ml).

### **24.3. RT-PCR QUANTITATIVA A TEMPS REAL**

La determinació dels nivells d'ARNm es realitzaren mitjançant la tècnica d'RT-PCR quantitativa a temps real. Es va utilitzar un *kit* comercial iScript™ One-Step RT-PCR amb SYBR®Green (Bio-Rad), seguint les especificacions del fabricant:

- 40 ng d'ARN total
- 0.3 mM de cebadors (*primers*)
- 12.5 µl de barreja de reacció 2x
- 0.5 µl de solució amb retrotranscriptasa

La barreja final (25 µl) es va introduir al termociclador i es va executar el següent programa:

- 10 min a 50°C
- 5 min a 95°C
- 49 cicles:
  - o 15 s a 95°C
  - o 35 s a 57°C
  - o 25 s a 72°C

Cada reacció es va realitzar per duplicat i el *threshold* ( $C_T$ ) per a cada ARNm es van comparar amb l'ARNm control de la proteïna GAPDH en el primer estudi, i de la proteïna ribosomal 18s en el segon estudi. Es va fer la mitja i es va convertir de logaritme a lineal. Els cebadors utilitzats per l'ARN de ratolí varen ser els següents:

ASMasa sentit	5'- GTCAGCCGTCCATCTCTTTGA-3';
ASMasa antisentit	5'-GGTCCCAGTG TAGATCAGTAA-3';
GAPDH sentit	5'-CGACCCCTTCATTGACCTCAA-3';
GAPDH antisentit	5'-CCTTCTCCATGGTGGTGAAGA-3'.

---

clAP sentit	5'- GTGGAACATGCCAAGTGGTT -3';
clAP antisentit	5'- GGAGGCAATACAGCATTGGT -3';
MnSOD sentit	5'- AACTCAGGTCGCTCTTCAGC-3';
MnSOD antisentit	5'- GAACCTTGGACTCCCACAGA-3' ;
TNF sentit	5'-CTGAACTTCGGGGTGATCGGT -3';
TNF antisentit	5'-ACGTGGGCTACAGGCTTGTCA -3';
IL-1 $\beta$ sentit	5'-GAGCTGAAAGCTCTCCACCTC -3' ;
IL-1 $\beta$ antisentit	5'- CTTTCCTTTGAGGCCCAAGGC-3' ;
18s sentit	5'-GTAACCCGTTGAACCCATT -3' ;
18s antisentit	5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG -3' .

## **RESULTATS**



## ◆ PRIMER ESTUDI

### 1. Acumulació transitòria de ceramida per activació seqüencial de l'esfingomielinasa àcida i la ceramidasa àcida durant la I/R

En primer lloc ens vàrem proposar analitzar els canvis en els nivells de ceramida durant el procés d'isquèmia/reperfusió i vam poder observar que els nivells de ceramida incrementen de manera transitòria durant la fase de reperfusió comparat amb els controls. Veiem un pic als 30 minuts i un altre a les 6 hores de reperfusió [figura 17A], tornant als nivells basals després de les 6 hores.

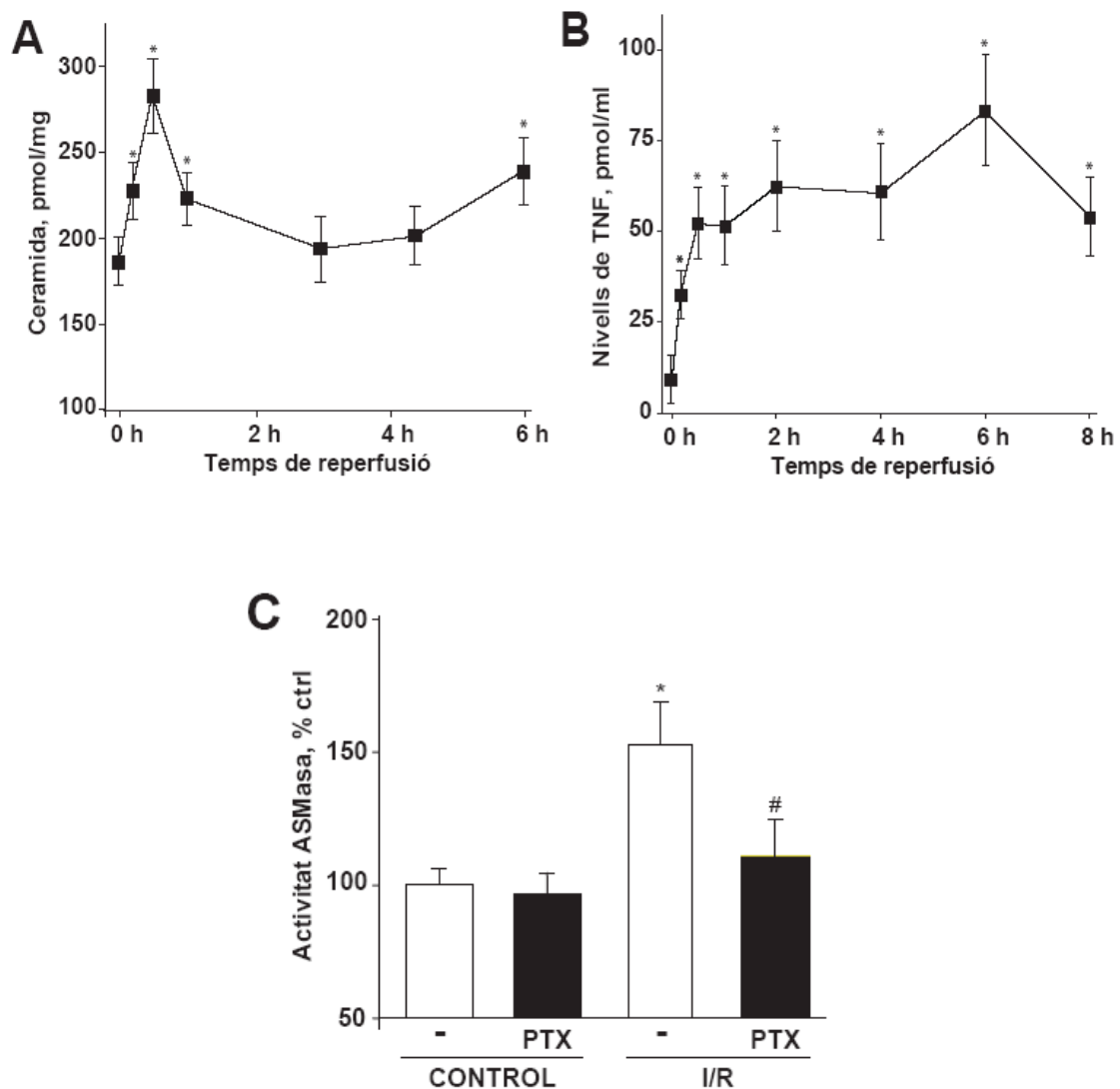
Degut a que els nivells de ceramida reflecteixen el balanç entre la seva generació i metabolisme, seguidament vam analitzar l'activitat dels enzims involucrats en la regulació de la ceramida. Com es pot veure, únicament les activitats de l'esfingomielinasa àcida i de la ceramidasa àcida estan implicades durant la fase de la reperfusió, i no observem canvis en l'activació de l'esfingomielinasa neutra, la glucosilceramida sintasa o la ceramidasa neutra [figura 18A-E]. En canvi, l'activitat esfingomielina sintasa, disminueix entre 1 i 3 hores de reperfusió [figura 18F].

Els nivells de ceramida tenen un pic entre els 15-30 minuts després de l'exposició a I/R degut a l'activació de l'esfingomielinasa àcida.

Una hora després de la reperfusió, l'activitat ceramidasa àcida incrementa, resultant en una eliminació de la ceramida. Com a conseqüència, la ceramida torna als seus nivells control després de tres hores. Per tant, el fetge respon a la formació de ceramida induïda per I/R, transformant la ceramida a lípids antiapoptòtics com són l'esfingosina-1-fosfat, mitjançant l'activació de la ceramidasa àcida.

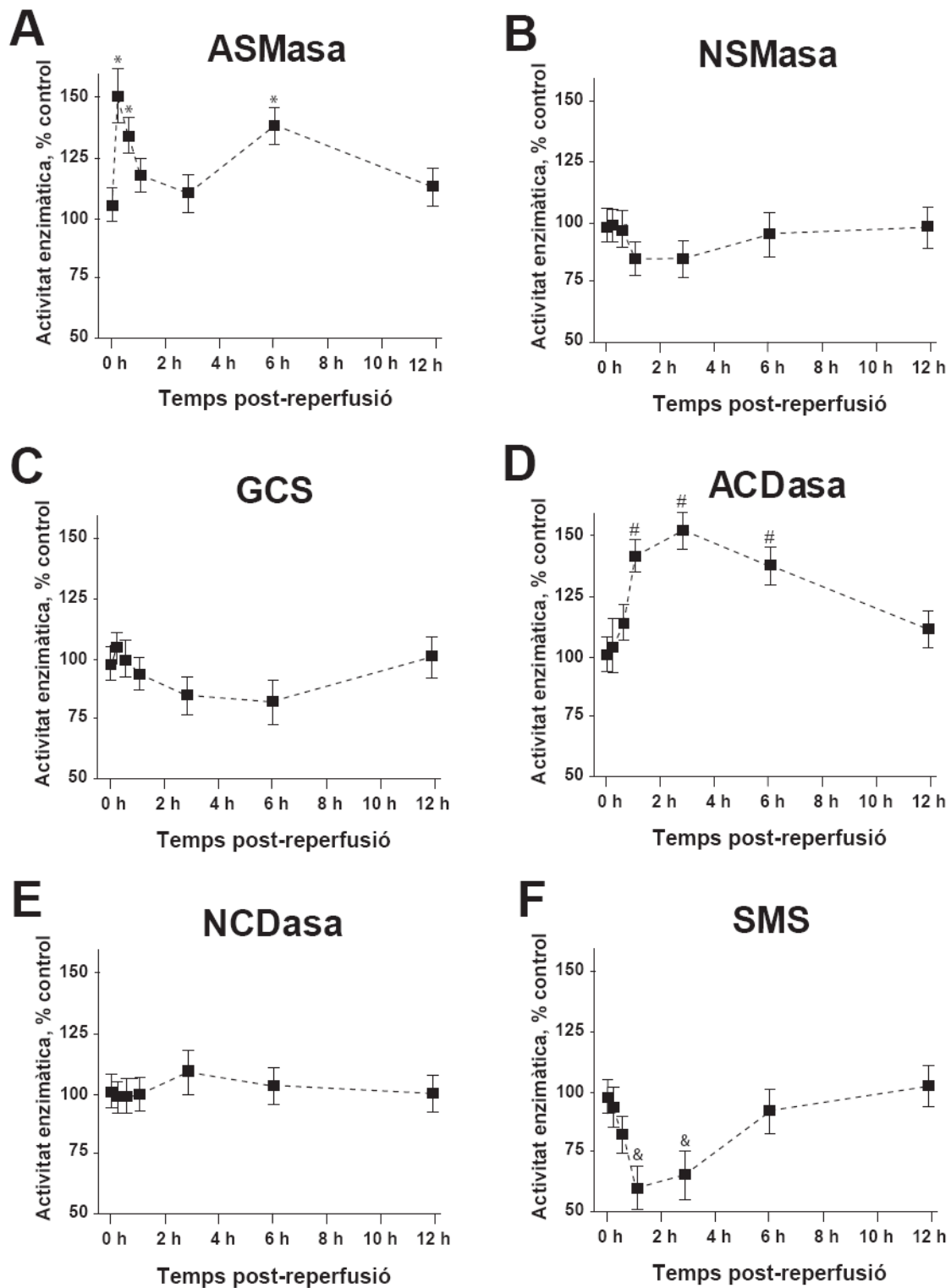
Com que el TNF activa l'esfingomielinasa àcida [106, 123], vàrem determinar la cinètica de la generació de TNF en sèrum durant la I/R [figura 17B]. En concordança amb anteriors resultats [186], vàrem observar un increment

primerenc dels nivells de TNF als 10-15 minuts de reperfusió i es mantenen fins les 8 hores [figura 17B]. A més, la pentoxifilina (PTX), inhibidor ben establert de la producció de TNF *in vivo*, que va prevenir el dany hepàtic induït per I/R, suprimia l'activació de l'esfingomielinasa àcida durant la I/R [figura 17C] i el subsegüent increment dels nivells de ceramida, indicant que la generació de TNF durant la I/R regula l'activació de l'esfingomielinasa àcida.



**FIGURA 17. Regulació de la ceramida durant la I/R.** (A) Els ratolins varen ser sotmesos a I/R i el contingut hepàtic de ceramida va ser determinat a diferents temps de reperfusió com s'indica. Els nivells de ceramida en els ratolins control van ser de  $171 \pm 18$  pmol/mg de proteïna ( $n = 3$ ).  $*P \leq .043$  versus control. (B) Els nivells de TNF van ser determinats en sèrum a diferents temps de reperfusió ( $n = 3$ ).  $*P \leq .012$  versus control. (C) L'activitat esfingomielinasa àcida va ser determinada en els extractes de fetge dels ratolins tractats amb vehicle i dels tractats amb pentoxifilina (PTX) als 15 minuts de reperfusió. Als ratolins control se'ls hi va realitzar la laparotomia sense I/R. ( $n = 3$ )  $*P = .017$  versus control.  $\#P = .033$  versus no tractats I/R.





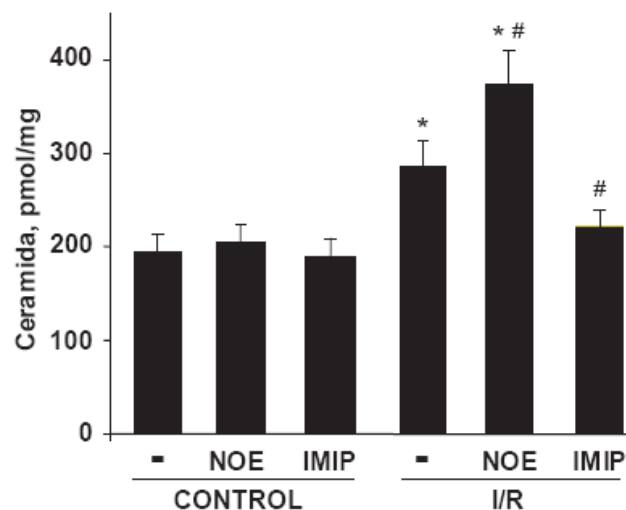
**FIGURA 18. Activació de l'ASMasa i l'ACDasa durant la I/R.** Les mostres de fetge es van agafar a diferents temps després de la I/R i varen ser homogeneïtzades per a mesurar les activitats enzimàtiques de ASMasa (A), NSMasa (B), GCS (C), ACDasa (D), NCDasa (E) i SMS (F) (n = 3-4). \* $P \leq .009$  versus control. # $P \leq .006$  versus control. & $P \leq .010$  versus control.

## **2. La regulació farmacològica de la ceramida, modula el dany hepàtic induït per I/R**

Per establir la relació entre l'activació de l'ASMasa/ACDasa i l'acumulació hepàtica de ceramida, vàrem provar l'efecte de la inhibició dels dos enzims en l'homeòstasi de la ceramida durant la I/R.

La imipramina, que inhibeix l'activació de l'esfingomielinasa àcida [123, 200], i la N-oleoyletanolmaina (NOE), un potent inhibidor de la ceramidasa àcida [192, 201], varen ser administrats intraperitonealment 30 minuts abans de realitzar la isquèmia.

La imipramina, que prevé l'activació de l'ASMasa induïda per I/R, disminueix els nivells de ceramida generats als 30 minuts de la reperfusió [figura 19]. Com s'espera, la NOE afavoreix l'acumulació de ceramida en el grup sotmès a I/R [figura 19]. Ni la imipramina ni la NOE modulen els nivells de ceramida hepàtics en els ratolins no isquèmics.

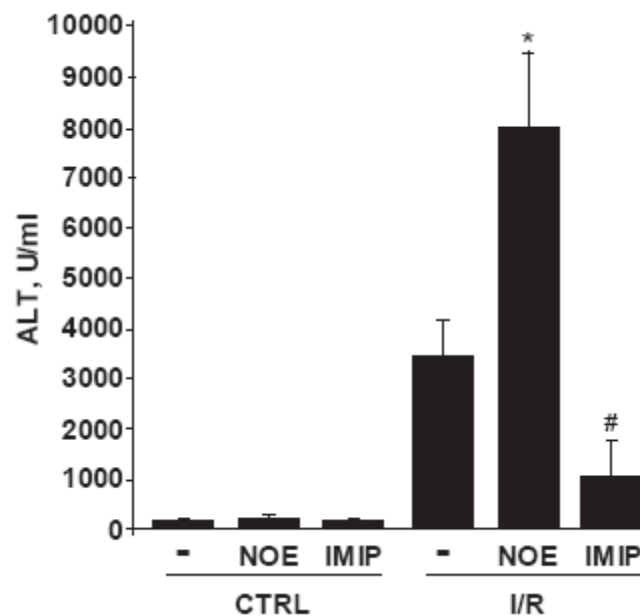


**FIGURA 19. Modulació dels nivells de ceramida.** Els nivells de ceramida es varen quantificar en els fetges als 30 minuts de reperfusió. En alguns casos, els ratolins es varen tractar amb l'inhibidor de l'esfingomielinasa àcida (imipramina, 25 mg/kg), l'inhibidor de la ceramidasa àcida (NOE, 100 mg/kg) o amb vehicle (sali) 30 minuts abans de realitzar la isquèmia. Els animals control se'ls hi va realitzar la laparotomia sense I/R. (n=3). \* $P < .011$  versus control # $P < .045$  versus isquèmics no tractats.

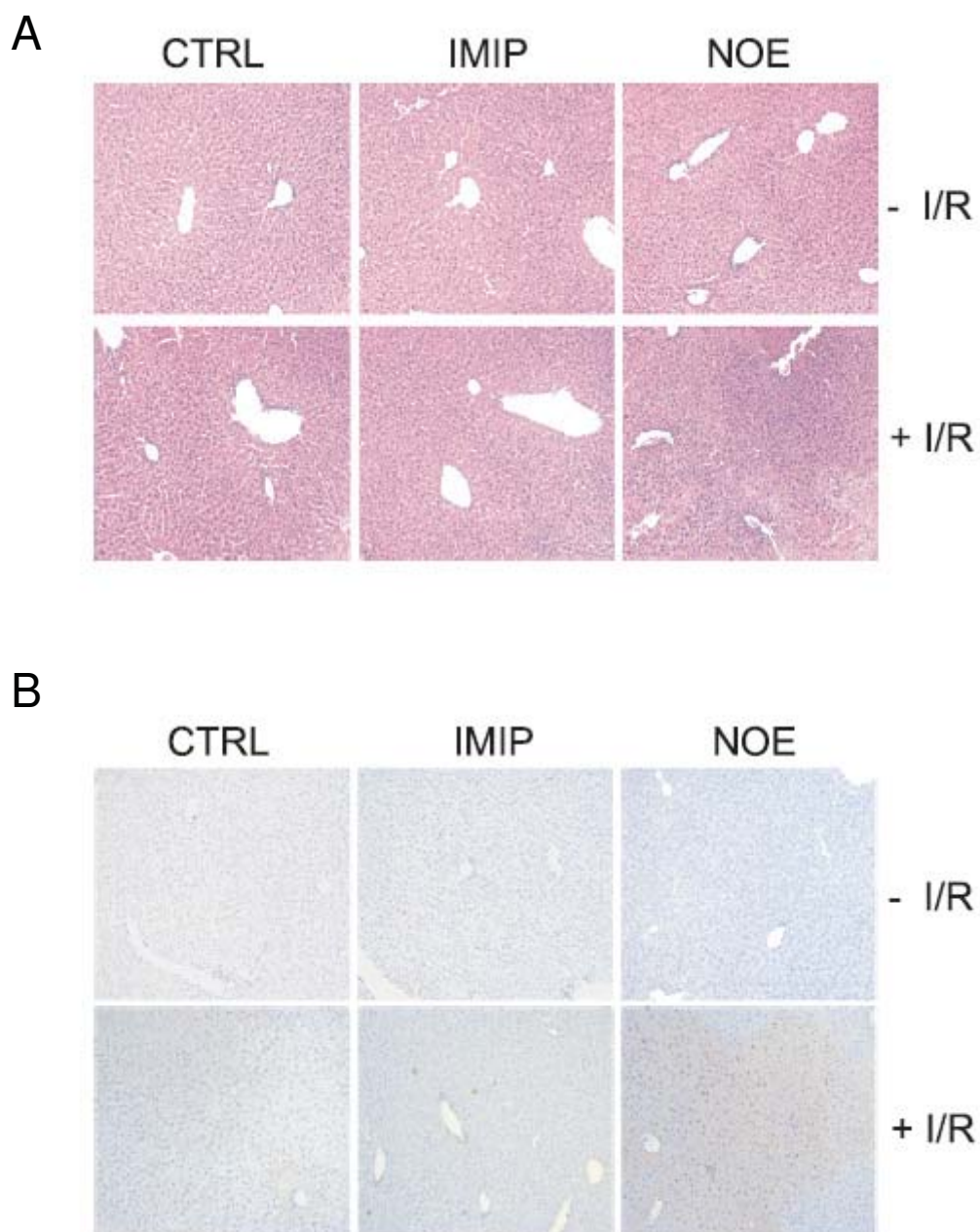
També vàrem examinar l'impacte de la regulació de la ceramida en el dany provocat per I/R. Com s'indica, la I/R causa un dany hepàtic que es reflecteix en els nivells d'alanina aminotransferases (ALT) en sèrum [figura 20] i en les histologies hepàtiques [figura 21A].

A més, vàrem observar un nombre significatiu de cèl·lules terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick-end labeling (TUNEL)- positives després de la I/R [figura 21B], consistent amb la coexistència d'oncosi necròtica i mort cel·lular apoptòtica.

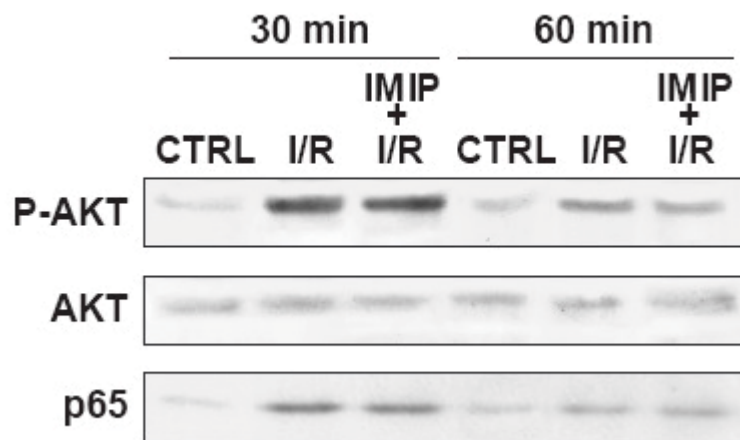
El pretractament amb imipramina protegeix el fetge contra el dany per I/R, com es veu en els nivells d'ALT [figura 20], les histologies i les tincions TUNEL, mentre que la NOE incrementa el dany hepàtic [figura 20, 21A-B]. El pretractament amb imipramina, però, no afecta a la fosforilació d'Akt o als nivells de p65 mesurats en extractes després de la I/R [figura 22], indicant que l'efecte protector de la imipramina no està relacionat amb la senyalització d'NF- $\kappa$ B.



**FIGURA 20. Modulació del dany hepàtic per I/R causat per la generació de ceramida.** Els nivells sèrics d'ALT van ser mesurats a les 6 hores de reperfusió dels animals control i dels exposats a I/R tractats amb imipramina (IMIP), NOE, o vehicle (n = 4). \* $P = .022$  i # $P = .031$  versus ratolins no tractats exposats a I/R.



**FIGURA 21. Modulació del dany hepàtic per I/R causat per la generació de ceràmida (A)** Hematoxilina-Eosina(HE) representatives i **(B)** imatges terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick-end labeling (TUNEL) de seccions de fetge a 6 hores de reperfusió (augment 10X).

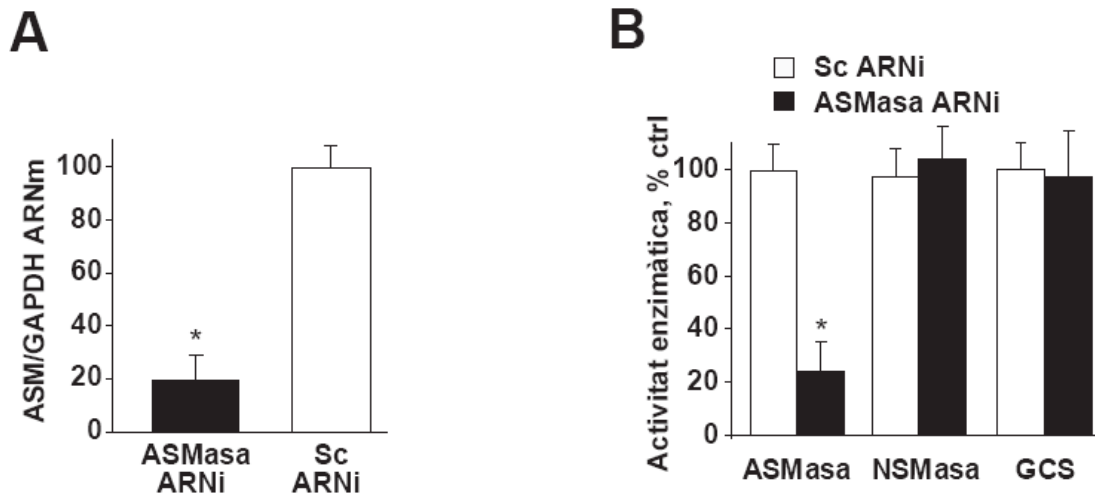


**FIGURA 22.** Western Blot representatiu de quatre experiments independents mostrant la fosforilació d'AKT en fraccions cel·lulars i nivells de p65 en extractes nuclears, després de 30 i 60 minuts de reperfusió.

### **3. El silenciament de l'esfingomielinasa àcida amb ARNi protegeix al fetge contra el dany induït per I/R**

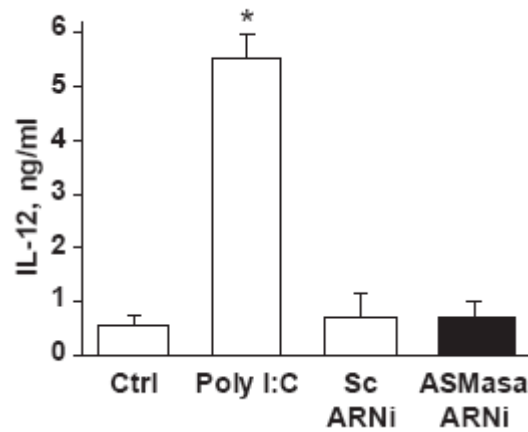
Per a validar la implicació de l'esfingomielinasa àcida en la generació de ceramida i de dany hepàtic, i per a verificar que amb la imipramina s'inhibeix aquest enzim i no altres proteïnes inespecífiques que podrien estar implicades, s'utilitzaren dues aproximacions. En primer lloc es va realitzar I/R en ratolins knockouts de l'esfingomielinasa àcida. La majoria d'ells (80%-90%) van morir ràpidament durant la isquèmia després de ser anestesiats degut a disfuncions pulmonars que ja han estat caracteritzades anteriorment [202]. De tal manera que vam decidir utilitzar un altre recurs alternatiu per a la pèrdua de funció com els ARNs d'interferència, que han estat utilitzats de manera exitosa en el silenciament de l'expressió de gens en el fetge [203, 204]. L'eficàcia dels ARNi per a disminuir els nivells d'ARNm d'esfingomielinasa àcida va ser verificada en les cèl·lules Hepa1c1c7 per PCR a temps real [figura 23A], i va ser acompanyat per una reducció de l'activitat ASMasa endògena [figura 23B], en canvi l'ARNi control de seqüències aleatòries (ScARNi) no mostrava cap efecte.

A més, l'ARNi de l'ASMasa no afectava a les activitats endògenes de la NSMasa o la GCS [figura 23B] com tampoc les activitats ACDasa, NCDasa o SMS.



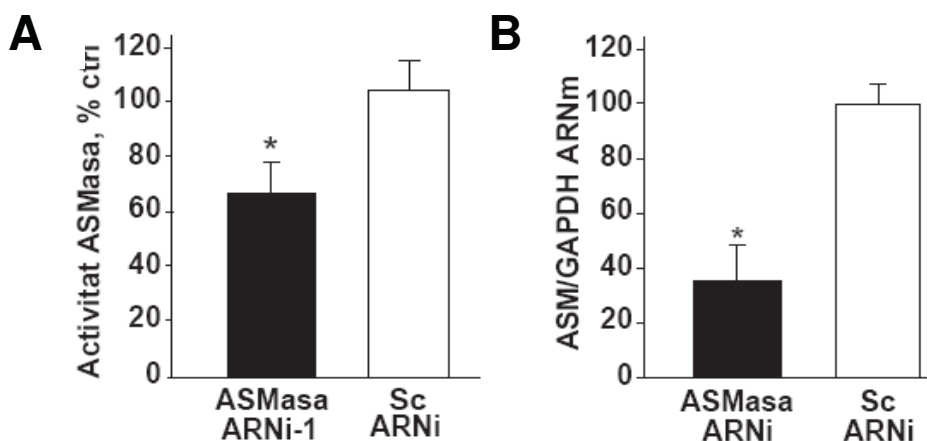
**FIGURA 23. Transfecció d'ARNi de l'ASMasa.** Les cèl·lules d'hepatoma murines H1c1c7 van ser transfectades amb ARNi de l'ASMasa o ARNi control de seqüències aleatòries. **(A)** Els nivells d'ARNm d'ASMasa es van mesurar 36 hores després (n = 4). \*P = .001 versus cèl·lules transfectades amb ScARNi. **(B)** Les activitats ASMasa, NSMasa i GCS es varen analitzar en els extractes cel·lulars (n = 4). \*P = .001 versus cèl·lules transfectades amb ScARNi

Els dúplex d'ARN de cadena doble poden provocar respostes immunes via interaccions amb els Toll-like receptors 3 i 9 [205], així que vàrem investigar aquesta possibilitat examinant la involucració de respostes immunes en els efectes potencials de l'ARNi de l'ASMasa en la I/R hepàtica *in vivo*. Els nivells d'interleucina-12 (IL-12) varen ser mesurats en els ratolins dos hores després de la injecció de l'ARNi de l'ASMasa, l'ARNi control o salí amb respecte als ratolins tractats amb Poli I:C, un anàleg d'ARN de cadena doble que és reconegut pel TLR3 i provoca resposta immune en els ratolins [205]. Com es pot veure, no es van detectar increments significatius en els nivells sèrics d'IL-12 en els ratolins tractats amb l'ARNi de l'ASMasa en contrast amb l'efecte observat en els ratolins tractats amb Poly I:C [figura 24].

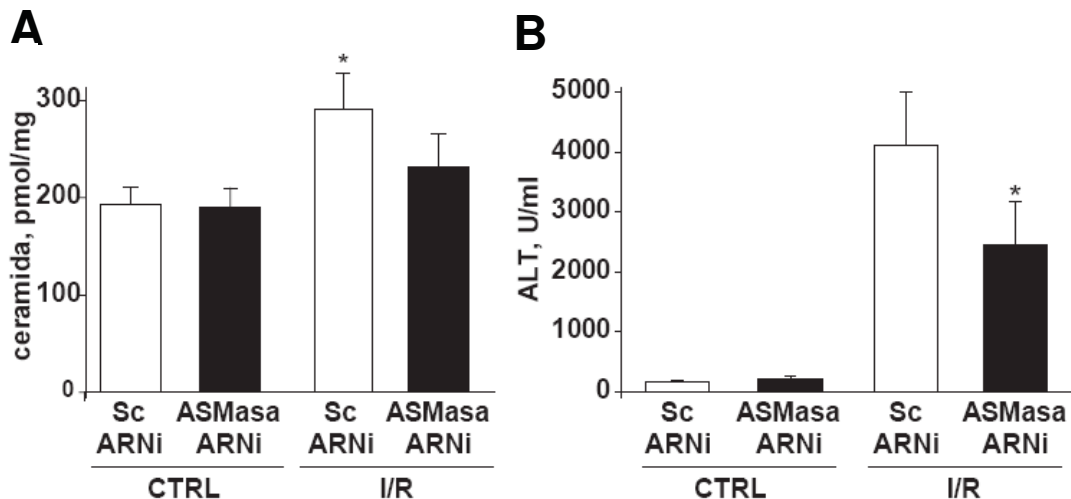


**FIGURA 24.** Nivells sèrics d'IL-2 dels ratolins injectats amb salí, Poly I:C, ARNi control o ARNi d'ASMasa 24 hores abans de la cirurgia (n = 3). \* $P = .005$  versus animals injectats amb salí.

Seguidament, se'ls hi va injectar l'ARNi de l'ASMasa i l'ARNi control per cua als ratolins durant dos dies consecutius i després varen ser sotmesos a I/R el dia posterior a la última dosi. L'ARNi de l'ASMasa va disminuir els nivells hepàtics d'ARNm de l'ASMasa i va inhibir l'activitat de l'ASMasa [figura 25] provocant una reducció en els nivells de ceràmida després de la reperfusió [figura 26A]. De manera important, l'ARNi de l'ASMasa redueix el dany hepàtic induït per I/R monitoritzat amb els nivells d'ALT en sèrum [figura 26B], histologies o TUNEL. Aquestes dades estableixen un rol clau de l'ASMasa en el dany hepàtic per I/R.



**FIGURA 25.** Supressió específica *in vivo* de l'ARNm de l'ASMasa. (A) l'ARNi de l'ASMasa inhibeix l'activitat d'aquest enzim (B) ARNm de l'ASMasa mesurat per PCR a temps real després de dues injeccions intravenoses amb l'ARNi de l'ASMasa o amb l'ARNi control (ScARNi) 24 hores abans de la cirurgia. Els resultats estan expressats com a percentatge de canvi del quocient ASMasa/GAPDH ARNm en animals control (n = 4). \* $P \leq .012$  versus els animals injectats amb ScARNi.



**FIGURA 26.** La inhibició de l'activitat ASMasa per ARNi redueix el dany induït per I/R (A) Nivells de ceramida als 30 minuts de reperfusió de mostres de fetge dels ratolins tractats amb ARNi de l'ASMasa o ScARNi (aleatori) 24 hores abans de la cirurgia (n = 3). \* $P = .045$  versus animals injectats amb Sc ARNi. (B) Nivells sèrics d'ALT a les 6 hores de reperfusió dels animals tractats amb ARNi de l'ASMasa o ScARNi 24 hores abans de la cirurgia (n = 4). \* $P = .042$  versus animals exposats a I/R injectats amb ARNi aleatori (ScARNi).

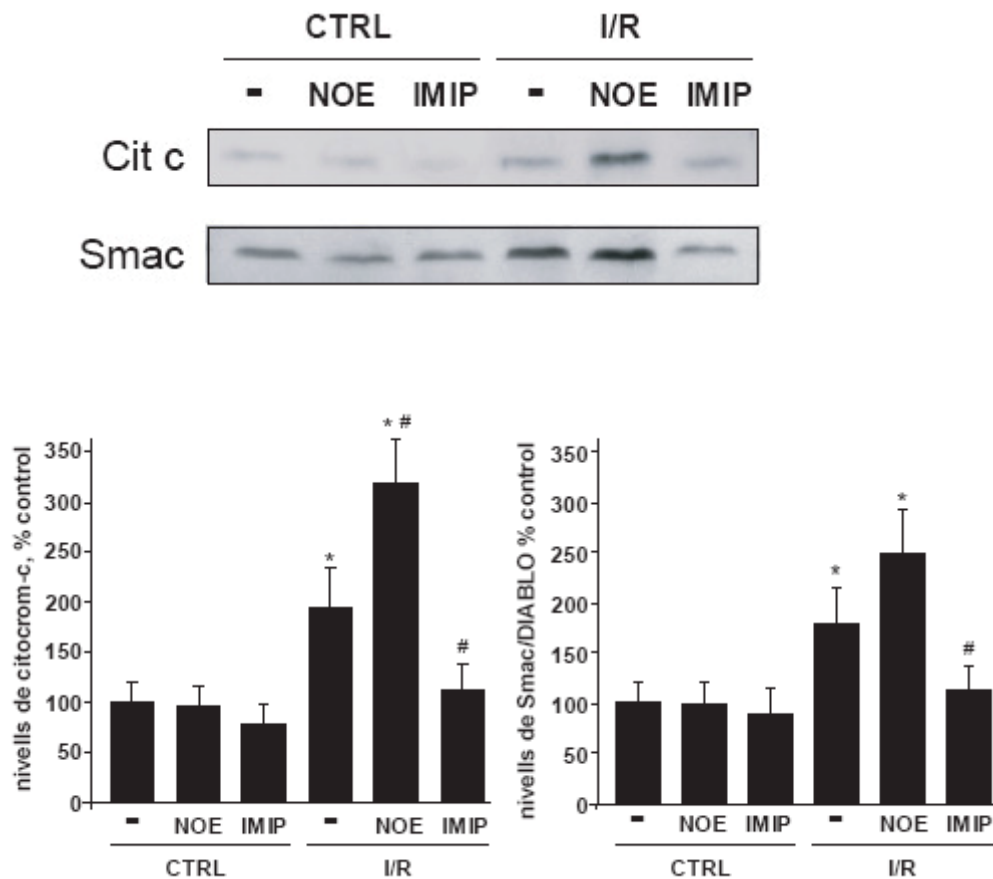
#### **4. La regulació de la ceramida durant la I/R modula la via mitocondrial de mort cel·lular**

Està establert que la ceramida té un rol important en les vies de mort cel·lular mitocondrials [26, 106], així que nosaltres vàrem examinar la sortida de citocrom c i Smac/DIABLO durant la I/R.

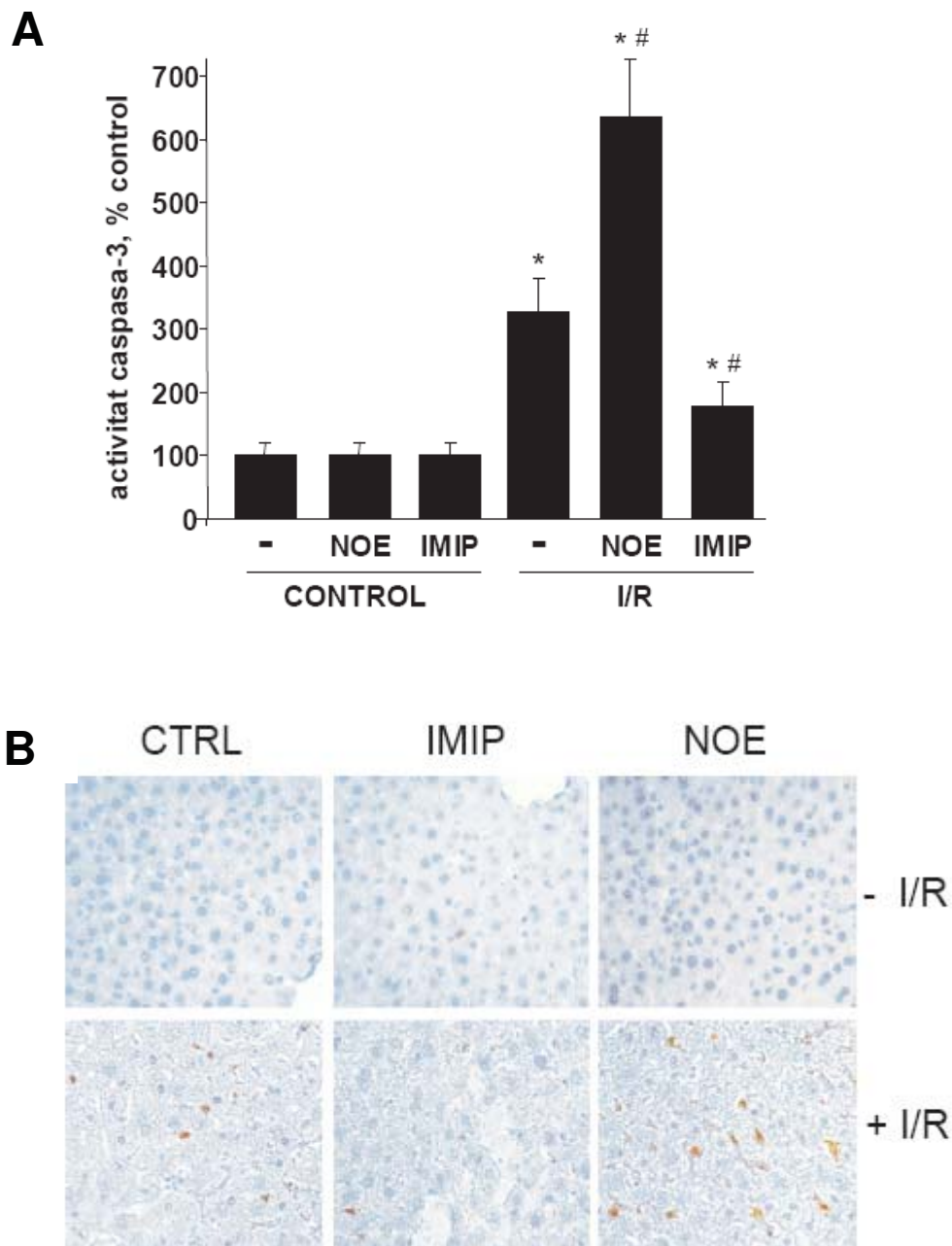
Com podem observar, la I/R provoca la sortida de citocrom c i Smac/DIABLO [figura 27]. Això, ve acompanyat per a una activació de casapasa-3 detectada per un assaig de fluorescència o immunohistoquímica [figura 28A-B]. El nombre de cèl·lules positives observades, és inferior a les tenyides per TUNEL [figura 21B]. Seguidament, vàrem examinar si el rol regulador de la ceramida en el dany per I/R hepàtica estava acompanyat amb canvis apropiats en la formació de l'apoptosoma. Així com el tractament amb imipramina redueix la sortida de citocrom c i Smac/DIABLO de la mitocòndria per I/R, la NOE promou la sortida d'aquestes proteïnes apoptogèniques de la mitocòndria [figura 27]. A més,



l'activació de caspasa-3 induïda per I/R va ser reduïda o incrementada pel pretractament amb imipramina o NOE respectivament [figura 28A-B].



**FIGURA 27. La ceramida modula la sortida mitocondrial de citocrom c durant la I/R.** Western Blot representatiu del citocrom c i Smac/Diablo al citosol 4 hores post-reperfusió amb el pretractament amb imipramina (IMIP), NOE o vehicle abans de la cirurgia. Els resultats són de tres experiments independents expressats com a percentatge amb respecte als animals control. \* $P \leq .031$  versus animals control. # $P \leq .048$  versus animals isquèmics tractats amb el vehicle.



**FIGURA 28. La ceramida modula l'activitat caspasa-3 durant la I/R. (A)** Activitat caspasa-3 en extractes de fetge a les 6 hores de reperfusió dels ratolins pretractats amb imipramina (IMIP), NOE o vehicle mesurada per fluorimetria (ex 380 nm, em 460 nm) ( $n = 4$ ).  $*P \leq .035$  versus animals control.  $\#P \leq .048$  versus animals isquèmics tractats amb el vehicle. **(B)** Tinció immunohistoquímica representativa de la caspasa-3 activa en seccions de fetge a les 6 hores de reperfusió (augment 40X) dels ratolins tractats amb imipramina (IMIP), NOE o vehicle abans de la cirurgia.

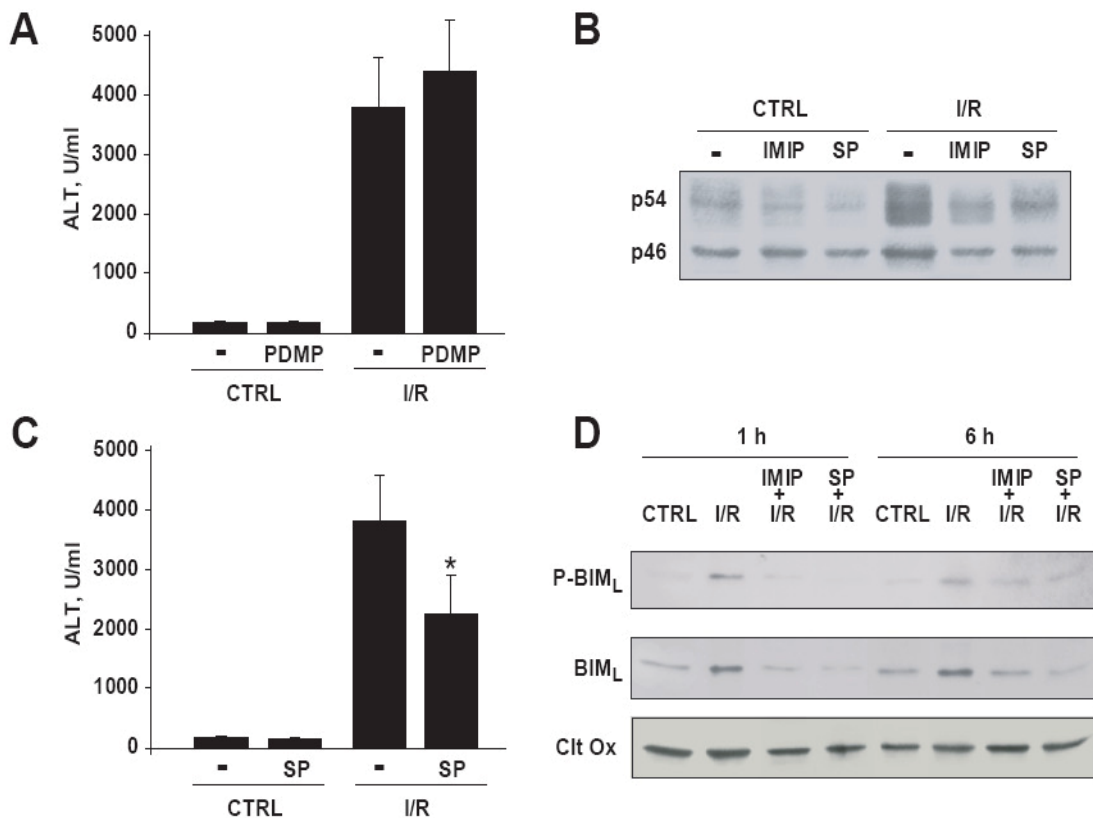
## **5. L'activació de JNK per I/R és suprimida per la inhibició de la esfingomielinasa àcida**

Per a identificar els intermediaris que intervenen després del dany hepàtic per I/R mediat per l'ASMas, ens vàrem centrar en el complex de glicoesfingolípids i gangliòsids perquè en hepatòcits en cultiu, el gangliòsid GD3 comporta mort cel·lular induïda per TNF [123]. Els gangliòsids són sintetitzats a partir de la ceramida per la seva glucosilació mitjançant la GCS. Aquesta, és inhibida per d-threo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-propanol HCl (PDMP) [123, 206]. Inesperadament, el tractament amb PDMP 30 minuts abans de la cirurgia no protegia el fetge front al dany per I/R [figura 29A], i això és consistent amb la manca d'activació de la GCS durant la I/R [figura 18C]. A més, no s'observaven canvis en el patró de gangliòsids durant la I/R, doncs descartem el rol dels gangliòsids en el dany induït per I/R.

S'ha descrit que la inhibició de JNK protegeix el fetge front a la mort cel·lular apoptòtica/necròtica [99], i el rol apoptòtic de la ceramida és exercit via activació de JNK [207-209]. Nosaltres, vàrem avaluar si el paper de la ceramida en el dany per I/R és mediat per l'activació de JNK. La I/R provoca la fosforilació de JNK (isoformes p46 i p54) [figura 29B], i això està acompanyat per una fosforilació de c-Jun. L'activació de JNK contribueix al dany hepàtic provocat per I/R ja que quan administrem SP600125, un inhibidor específic i potent de JNK [210], protegeix front al dany induït per I/R reflectit en els nivells sèrics d'ALT [figura 29C] o histologies.

De manera important, el tractament amb imipramina, que disminueix els nivells de ceramida generats i protegeix al fetge front la I/R [figura 19 i 20], prevé la fosforilació de JNK causada per I/R [figura 29B]. SP600125, però, no prevé l'increment primerenc dels nivells de ceramida durant la fase de reperfusió, o l'activació de l'esfingomielinasa àcida, indicant que l'activació de JNK és per sota de la ruta de l'estimulació d'esfingomielinasa àcida durant la I/R. A més, com que la fosforilació induïda per ceramida i la translocació de Bim a la mitocòndria estan mediat per JNK [207], vàrem analitzar l'anomenada

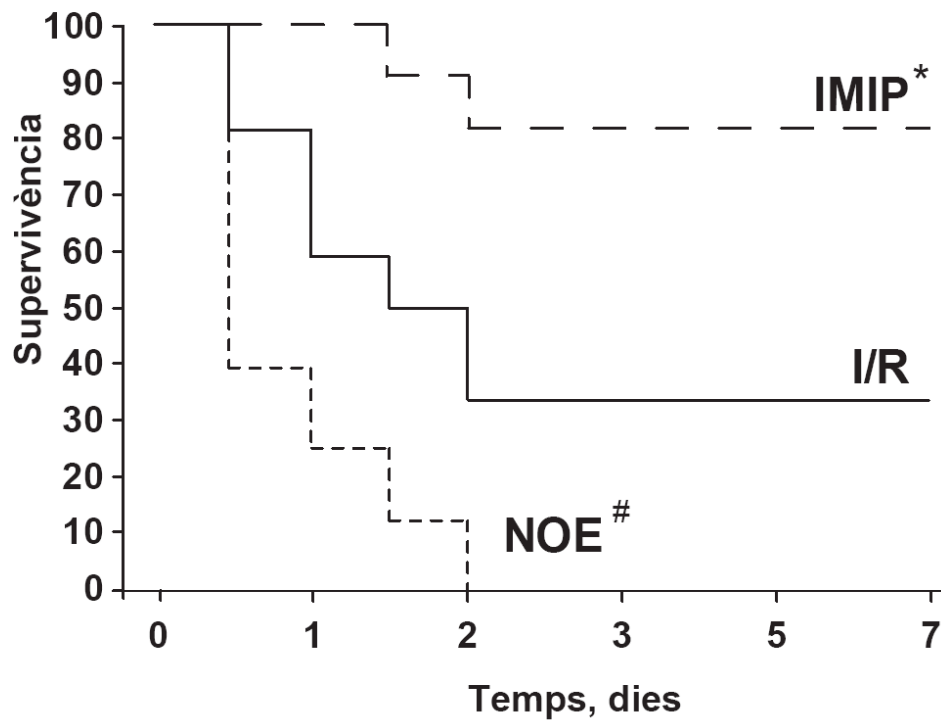
fosforilació durant la I/R. Com es veu, ambdós BimL i la seva forma fosforilada transloquen a la mitocòndria i, més important, la imipramina i l'SP600125 suprimeixen aquests processos [figura 29D].



**FIGURA 29. La inhibició de l'activació de JNK induïda per la ceramida generada via ASMa però no via GCS protegeix front la I/R hepàtica. (A)** Nivells sèrics d'ALT 6 hores després de la reperfusió en ratolins tractats amb PDMP (75 mg/kg) o vehicle (5 % Tween 20 en salí) abans de la cirurgia (n = 4). **(B)** Western Blot representatiu de la fosforilació de JNK en extractes de fetge 30 minuts després de la reperfusió. En alguns casos, els ratolins varen ser tractats amb SP600125 (SP) o imipramina (IMIP) 30 minuts abans de la isquèmia. **(C)** Nivells sèrics d'ALT 6 hores després de la reperfusió en ratolins tractats amb l'inhibidor de JNK (SP600125, 20 mg/kg), o vehicle (1 % dimetilsulfòxid en salí) abans de la cirurgia (n = 5) \**P* = .024 versus ratolins amb I/R no tractats. **(D)** 1 i 6 hores després de la I/R les mostres de fetge dels ratolins pretractats amb vehicle, IMIP o SP600125 varen ser processades per a l'aïllament dels mitocondris per a examinar els nivells de Bim, fofo-Bim, i citocrom c oxidasa per Western Blot.

## **6. La regulació de la ceramida modula la supervivència després de la I/R total hepàtica**

Seguidament, vàrem examinar la supervivència en un model d'I/R total hepàtica en el qual la supervivència depèn de la recuperació del fetge isquèmic durant la reperfusió. Els ratolins (n = 8-12 per grup) varen ser sotmesos a 60 minuts d'isquèmia, en lloc dels 90 minuts que utilitzem en els experiments d'isquèmia parcial perquè aquest protocol feia morir els ratolins durant les 24 hores de I/R total hepàtica. Sota aquestes condicions, 8 de 12 ratolins tractats amb el vehicle sotmesos a isquèmia total van morir durant les primeres 72 hores post-reperfusió [figura 30], amb avaluacions histològiques en autòpsies mostrant necrosi massiva en el fetge, amb concordança amb dades prèvies [99, 178]. En canvi, el tractament amb imipramina va millorar marcadament la supervivència, on 9 de 11 ratolins tractats varen sobreviure després de 7 dies post-reperfusió [figura 30]. En contrast, tots els ratolins tractats amb NOE (8 de 8) varen morir durant les 48 primeres hores postisquèmia, amb un 75% dels animals morint durant les 24 primeres hores de reperfusió [figura 30]. Doncs, aquestes dades demostren la rellevància de la modulació farmacològica de la ceramida en el dany induït per I/R.



**FIGURA 30. La regulació de ceramida modula la supervivència després d'una isquèmia total hepàtica.** Els ratolins tractats amb vehicle (salí), imipramina (IMIP) (25 mg/kg) o NOE (100 mg/kg) abans de la cirurgia varen ser sotmesos a isquèmia total hepàtica durant 60 minuts. Els animals varen ser monitoritzats dos cops per dia durant 7 dies. \* $P = .035$  i # $P = .013$  versus ratolins isquèmics tractats amb salí,  $n = 8-12$  a cada grup.

---

## ◆ SEGON ESTUDI

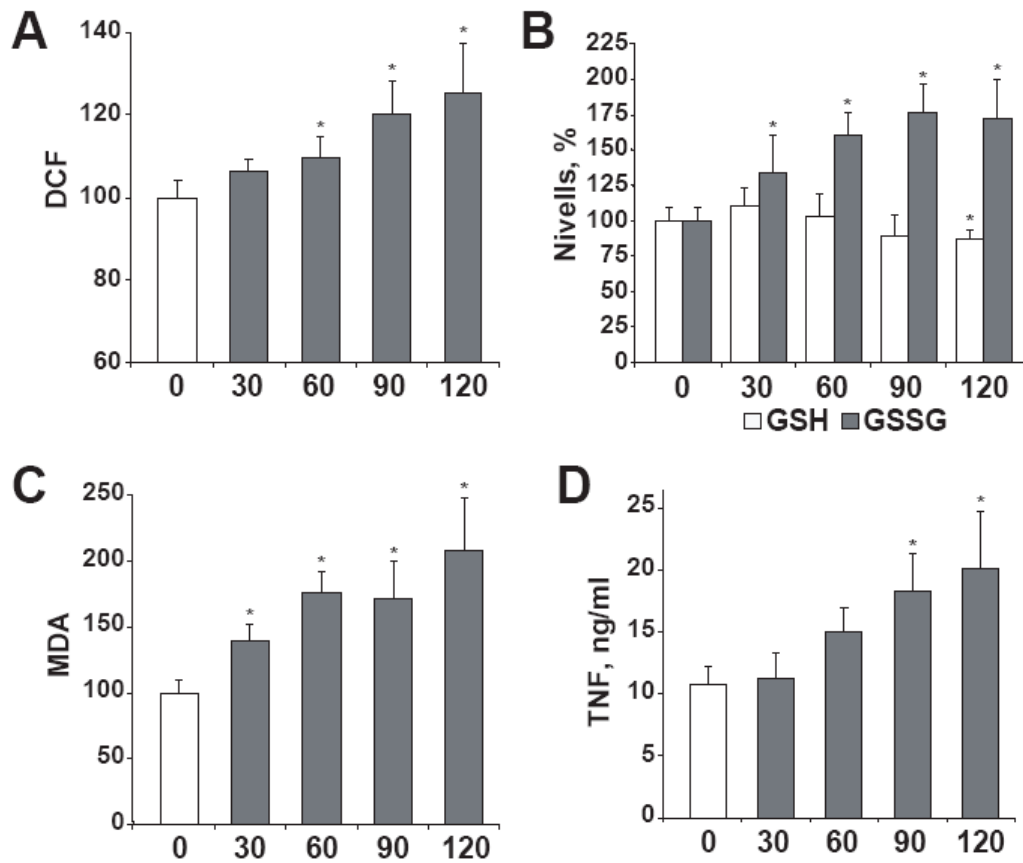
### 7. Estrès oxidatiu i secreció de TNF durant la I/R

Les espècies reactives d'oxigen (ROS) i el TNF juguen un paper important en diferents patologies hepàtiques, com en el dany induït per I/R, i es coneixen com a moduladors de l'activació d'NF- $\kappa$ B. Per això, nosaltres vàrem decidir mesurar els paràmetres relacionats amb l'estrès oxidatiu i la producció de TNF durant la isquèmia per tal de poder examinar el seu impacte en l'expressió de gens NF- $\kappa$ B dependents i en el dany hepàtic.

Per tal d'analitzar aquests factors, induïm diferents temps d'isquèmia (de 0 a 120 min), i agafem mostres de fetge al final de la fase de reperfusió (1 hora).

La producció de radicals incrementa progressivament a mesura que avança la isquèmia seguit de 60 minuts de reperfusió [figura 31A]. Fins i tot a temps curts d'isquèmia (30 min), es va detectar estrès oxidatiu intracel·lular, juntament amb un increment significatiu en els nivells de GSSG [figura 31B], que afectava al quocient GSH/GSSG i a l'increment de la peroxidació lipídica [figura 31C]. A més, a mesura que el temps d'isquèmia incrementava, els nivells de ROS, MDA i GSSG eren progressivament més elevats en les mostres de fetges reperfosos.

En paral·lel amb aquests canvis vam observar també un increment significatiu dels nivells de TNF després d'una hora d'isquèmia, i es mantenen elevats fins a períodes d'isquèmia més llargs [figura 31D]. Aquestes dades demostren la inducció d'estrès oxidatiu en funció del temps d'isquèmia seguit de reperfusió.



**FIGURA 31. Variació de l'estrès oxidatiu intracel·lular i dels nivells de TNF en el fetge durant el temps d'isquèmia.** Es van obtenir les mostres dels animals exposats a diferents temps d'isquèmia (no isquèmic, 30, 60, 90, 120 minuts d'isquèmia). Després d'una hora de reperfusió es va analitzar en les mostres de fetge la producció de ROS (**A**), els nivells de glutatió oxidat i reduït (**B**) i els nivells d'MDA (**C**). Els nivells de TNF (**D**) es varen analitzar en els sèrums dels ratolins. ( $n \geq 3$ ) \* $P < .05$  vs animals control.

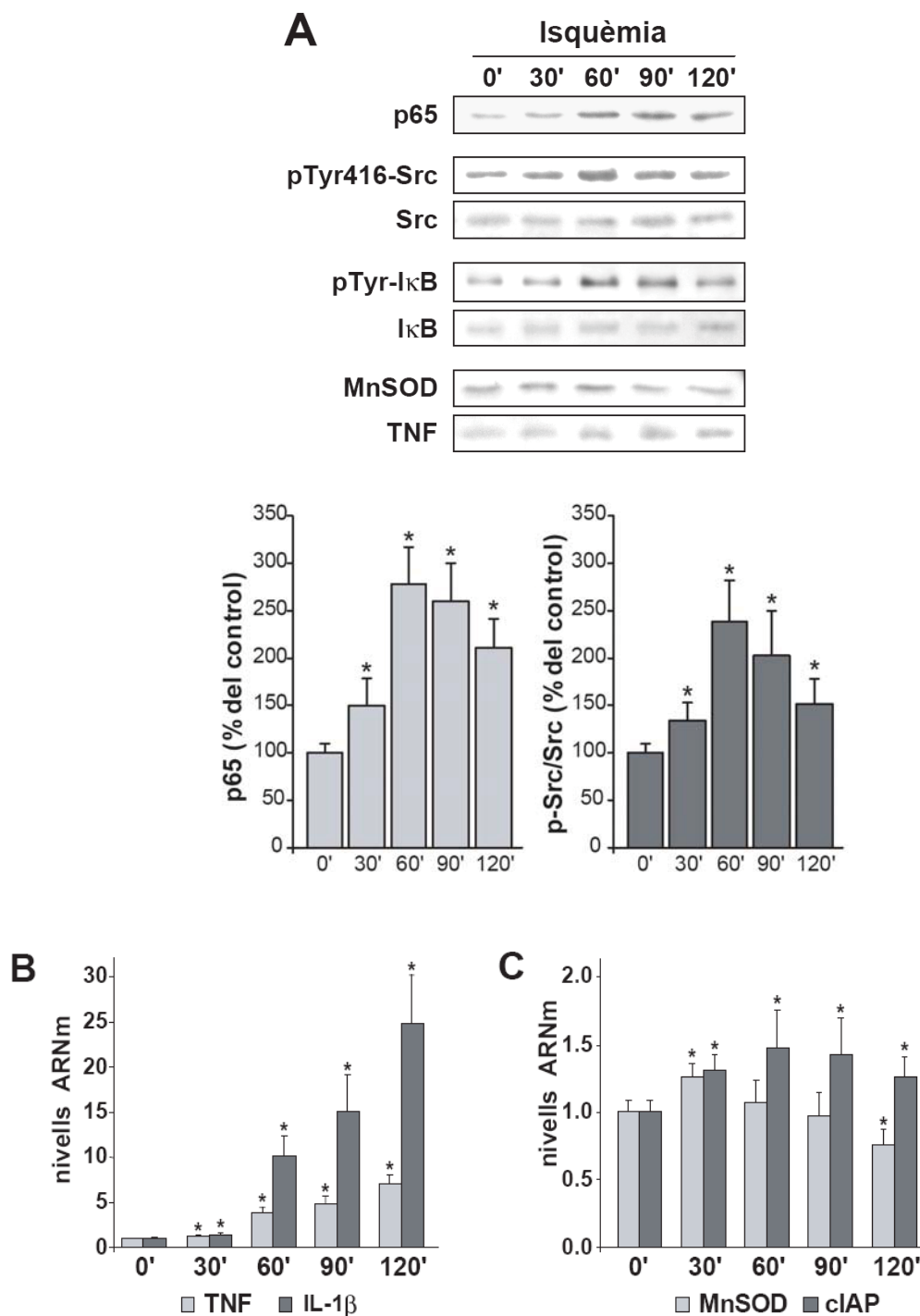


## **8. Expressió de gens proinflamatoris i antiapoptòtics $\kappa$ B-depenents durant la I/R**

Seguidament, vàrem examinar l'activació d'NF- $\kappa$ B a diferents temps mitjançant la translocació de p65 al nucli. Com es veu, de forma interessant, el nivell nuclear de p65 després d'una hora de reperfusió exhibeix un patró dual depenent del temps d'isquèmia, incrementant durant els primers 60 minuts de la isquèmia, i disminuint a temps més llargs [figura 32A].

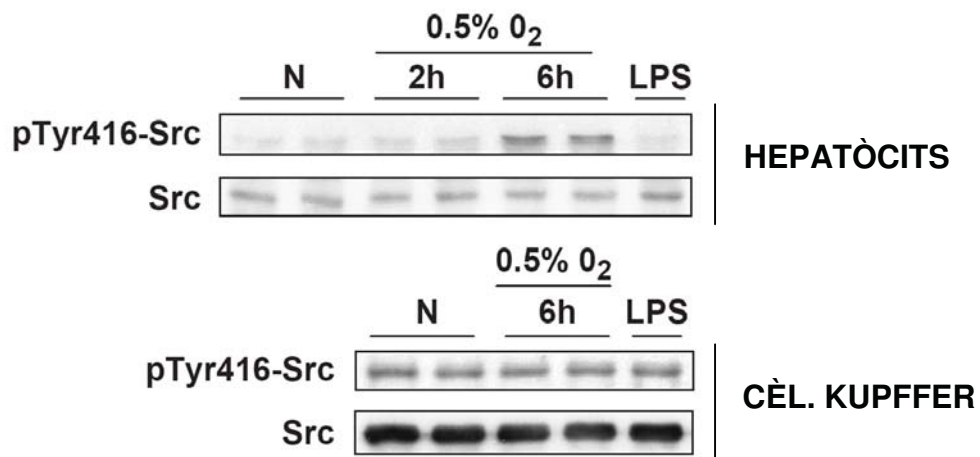
Així com les tirosin cinases, particularment Src, s'han vist involucrades en l'activació d'NF- $\kappa$ B [66, 71, 74, 78, 79], nosaltres vàrem examinar la seva activació reflectida amb la fosforilació de Src en la tirosina 416. Com es veu, la fosforilació de Src presenta un patró d'activació durant la isquèmia similar a la translocació de p65 [figura 32A], demostrant la implicació d'aquesta tirosina cinasa en l'activació d'NF- $\kappa$ B. A més, es va detectar un increment paral·lel de fosforilació en residus tirosina d'I $\kappa$ B- $\alpha$  immunoprecipitat d'extractes de fetge, després dels diferents períodes d'isquèmia [figura 32A].

Ha estat demostrat que els nivells nuclears de p65 en els hepatòcits no necessàriament reflecteixen la transactivació d'NF- $\kappa$ B en situacions de substancial estrès oxidatiu i disminució de GSH [81]. Per a analitzar aquest aspecte, vàrem determinar el patró d'activació de diversos gens  $\kappa$ B depenents en funció del temps d'isquèmia. Com es veu, els nivells d'ARNm dels gens proinflamatoris  $\kappa$ B depenents com el TNF i la IL-1 $\beta$  són regulats a l'alça a mesura que incrementa el període d'isquèmia [figura 32B]. En canvi, nosaltres hem observat que els nivells d'ARNm dels gens de supervivència  $\kappa$ B depenents com Ciap-2 incrementen de manera moderada. De manera interessant, els nivells d'ARNm de la MnSOD incrementen durant els 30 primers minuts d'isquèmia i disminueixen posteriorment [figura 32C]. A més, per a validar els resultats obtinguts amb l'anàlisi de l'ARNm, vàrem examinar l'expressió de les proteïnes MnSOD i TNF en mostres de fetge per western blot. Com es veu [figura 32A], la MnSOD disminueix a mesura que avança el temps d'isquèmia, mentre que el TNF incrementa.

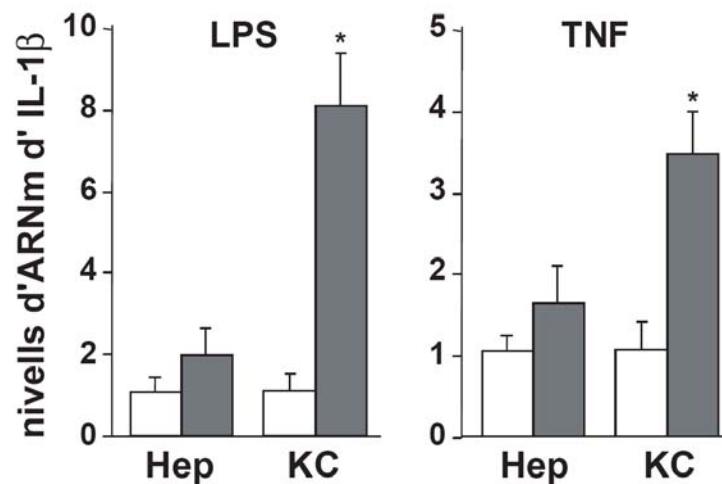


**FIGURA 32. Increment temporal dels nivells nuclears de p65, fosforilació de Src i expressió dels gens  $\kappa B$  dependents. (A)** La translocació de p65 al nucli, la fosforilació de Src i la fosforilació en tirosines d'I $\kappa$ B varen ser mesurats després d'una hora de reperfusió en mostres de fetge de diferents temps d'isquèmia. Es mostra un blot representatiu (n = 3). Està inclosa la quantificació dels nivells de p65 i el ratio p-Src/Src. (n = 3). \* $P < .05$  vs ratolins control. Els nivells de MnSOD i TNF es van examinar en extractes totals de fetge a les 6h de reperfusió. Els nivells d'ARNm dels gens proinflamatoris NF- $\kappa$ B dependents **(B)** i els gens anitapoptòtics **(C)** varen ser mesurats 6 hores després de diferents temps d'isquèmia i normalitzats amb els nivells d'ARNm de 18s.

Aquest marcat contrast depenent del temps en l'increment dels nivells de l'ARNm dels gens proinflamatoris vs. els gens de supervivència pot reflectir l'activació d'NF- $\kappa$ B en diferents tipus cel·lulars específics. Per a provar això, vàrem examinar la fosforilació de Src i l'expressió d'ARNm d'IL-1 $\beta$  en hepatòcits primaris i cèl·lules de Kupffer (macròfags residents del fetge) de ratolí en resposta a la hipòxia, i exposició a LPS o TNF. Com es veu a la figura 33, la hipòxia fosforila Src en residus tirosina 416 de manera temporal en hepatòcits primaris de ratolí, però no passa el mateix en cèl·lules de Kupffer. A més a més, les cèl·lules de Kupffer tampoc fosforilen Src en resposta al TNF o LPS. Cal destacar que mentre que les cèl·lules de Kupffer tractades amb LPS exhibeixen una forta inducció dels gens pro-inflamatoris com IL-1 $\beta$  en resposta al LPS i TNF [figura 34], en els hepatòcits primaris exposats a LPS i TNF no incrementen els nivells d'IL-1 $\beta$  [figura 34]. Per tant, aquestes dades estableixen que l'activació d'NF- $\kappa$ B via fosforilació de Src per I/R té lloc en els hepatòcits, i que les cèl·lules de Kupffer són la font predominant de citocines proinflamatòries.



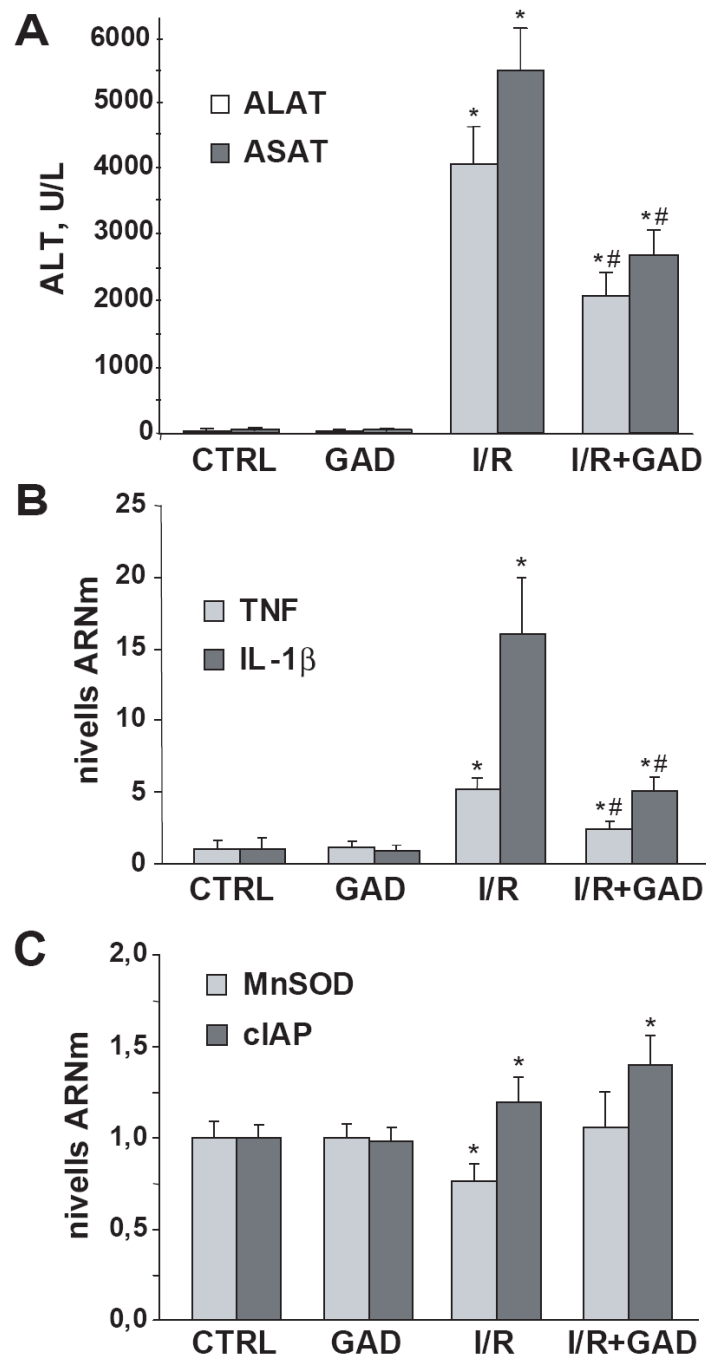
**FIGURA 33. Diferent comportament dels hepatòcits primaris i les cèl·lules de Kupffer en la fosforilació de Src.** Es va observar un increment de la fosforilació de Src en els hepatòcits hipòxics (0.5 % O<sub>2</sub>), però no després de l'exposició a LPS (2h, 0.1 ng/ml). Els nivells de p-Src no incrementen en les cèl·lules de Kupffer després de l'exposició a la hipòxia. Es mostren blots representatius (n = 2).



**FIGURA 34. Expressió d'IL-1 $\beta$ .** Canvis en els nivells de l'ARNm d'IL-1 $\beta$  en hepatòcits i cèl·lules de Kupffer després del tractament amb LPS (4h, 0.1 ng/ml) i TNF (4h, 250 ng/ml) (barres grises) respecte les cèl·lules no tractades (barres blanques) normalitzats amb els nivells d'ARNm de 18s. (n = 3). \* $P < .05$  vs cèl·lules no tractades.

## **9. La inactivació de les cèl·lules de Kupffer disminueix la producció de TNF/IL-1 $\beta$ durant la I/R**

Així com les dades indiquen que la generació de citocines proinflamatòries prové principalment dels macròfags, seguidament vàrem examinar la contribució de les cèl·lules de Kupffer en aquest procés durant la I/R utilitzant clorur de gadolini per a suprimir específicament la seva activitat *in vivo* [31, 34, 188] 24 hores abans de la cirurgia. Confirmant les dades prèvies, la inactivació de les cèl·lules de Kupffer protegeix front el dany hepàtic mediat per I/R, reflectit en la reducció dels nivells de ALT/AST [figura 35A]. Això ve acompanyat per una regulació a la baixa dels nivells d'ARNm de TNF i IL-1 $\beta$  [figura 35B]. En canvi, els nivells d'ARNm de MnSOD i cIAP-2 no es veuen afectats o es veuen lleugerament incrementats durant la I/R després del tractament amb clorur de gadolini [figura 35C], indicant que la font predominant de TNF/IL-1 $\beta$  durant la I/R són les cèl·lules de Kupffer, i que les cèl·lules parenquimals són els majors contribuïdors en la regulació a l'alça dels gens protectors  $\kappa$ B-dependents.

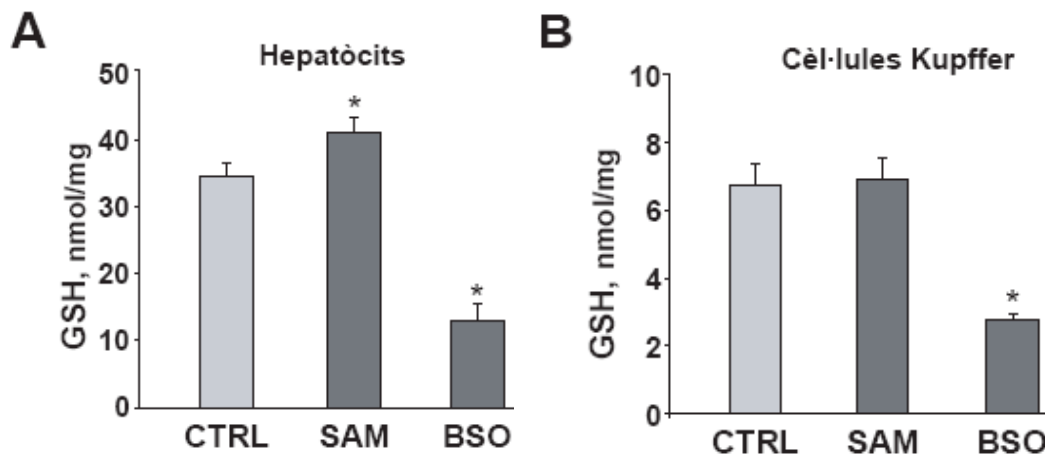


**FIGURA 35.** Efecte de la inactivació de les cèl·lules de Kupffer amb clorur de gadolini en el dany induït per I/R i la expressió de gens  $\kappa$ B dependents. Els ratolins tractats amb clorur de gadolini o vehicle varen ser sotmesos, després de 24 hores, a 90 minuts d'isquèmia i 6 hores de reperfusió. Es van analitzar els nivells d'ALT en sèrum (A) i els nivells d'ARNm dels gens proinflamatoris (B) i protectors (C). \* $P < .05$  vs animals control; #  $P < .05$  vs animals sotmesos a I/R.

## **10. La teràpia amb SAM incrementa selectivament els nivells de GSH emmagatzemat en les cèl·lules parenquimals protegint front el dany hepàtic mediat per I/R.**

Partint de que l'activació d'NF- $\kappa$ B i la fosforilació de Src depenen de la producció de ROS en els hepatòcits i essent el GSH el major antioxidant, vàrem decidir incrementar específicament els nivells de GSH en les cèl·lules parenquimals tractant els ratolins amb SAM abans de la I/R.

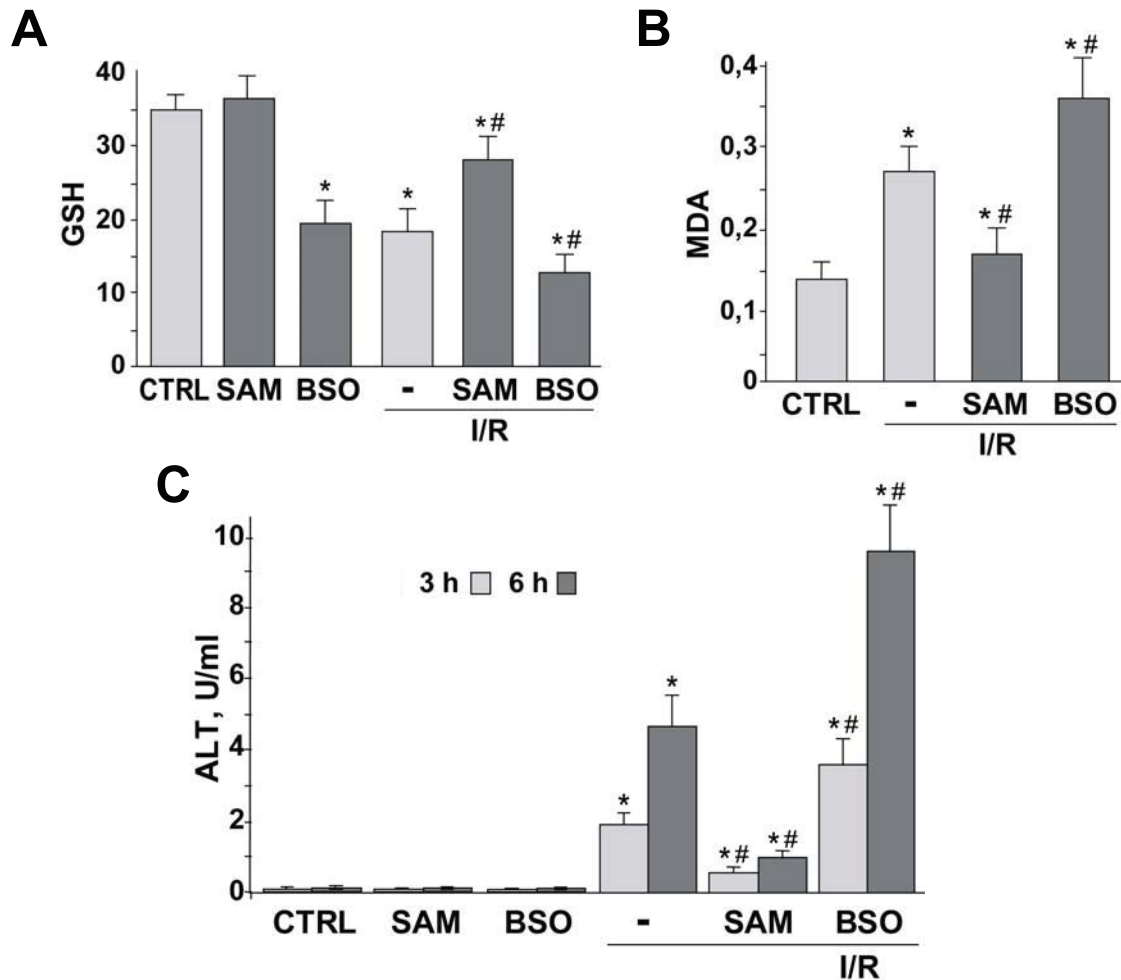
La capacitat del SAM per incrementar els nivells de GSH és rellevant en els teixits específics com el fetge o ronyó on la via de transsulfuració permet la conversió de la homocisteïna a cisteïna [211]. Donat que les metionina adenosiltransferases (MATs) són expressades en les cèl·lules de Kupffer així com en les cèl·lules endotelials hepàtiques [212], vàrem provar si el SAM exogen incrementava els nivells de GSH en cèl·lules de Kupffer i en hepatòcits aïllats. Els hepatòcits murins presenten un increment en el contingut de GSH a les 4 hores després de l'administració de 2mM de SAM [figura 36A]. En contrast, el contingut de GSH en les cèl·lules de Kupffer no variava després de l'exposició amb SAM, suggerint una menor capacitat de generar GSH per la via de la transulfuració [figura 36B]. En canvi, la incubació amb BSO, un inhibidor específic de la  $\gamma$ -GCS, enzim limitant en la biosíntesis del GSH, disminueix significativament els nivells de GSH de manera similar en ambdós tipus cel·lulars [figura 36A, B].



**FIGURA 36. Variació dels nivells de GSH amb SAM i BSO.** Les concentracions de GSH van ser mesurades en hepatòcits primaris (**A**) i cèl·lules de Kupffer (**B**) després de 4 hores d'exposició amb SAM (2 mM) i BSO (1 mM). (n = 2-3). \* $P < .05$  vs cèl·lules control.

Seguidament, vàrem examinar els efectes d'aquestes estratègies *in vivo* durant la I/R. Comparant amb els ratolins sotmesos a I/R no tractats, el tractament amb SAM va ser efectiu recuperant els nivells de GSH hepàtic, que disminueixen en les mostres no tractades després dels 90 minuts d'isquèmia i 6 hores de reperfusió [figura 37A]. En canvi, el pretractament amb BSO disminueix els nivells de GSH després de la I/R, comproment així la capacitat hepàtica per combatre amb l'estrès oxidatiu durant la I/R.

Conseqüentment, la teràpia amb SAM prevé eficientment l'increment de la peroxidació lipídica mesurada amb nivells de MDA durant la I/R, mentre que el tractament amb BSO promou aquest efecte [figura 37B].

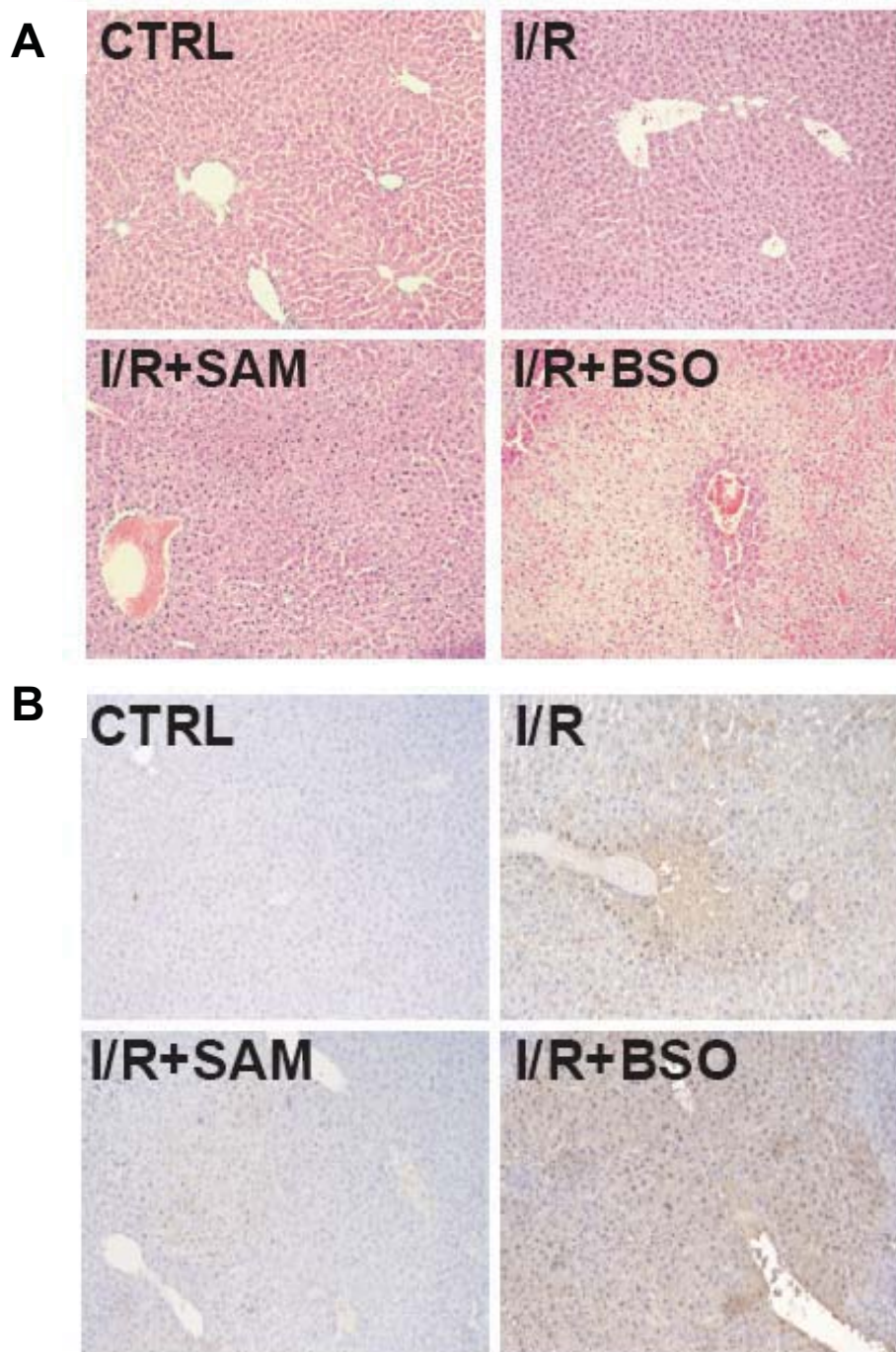


**FIGURA 37. Efecte diferencial del SAM i el BSO en els nivells de GSH hepàtic i en el dany hepàtic induït per I/R.** Els nivells de GSH hepàtic (A), la generació d'MDA (B) i el dany hepàtic mesurat per ALT en sèrum (C) dels animals tractats amb vehicle, SAM i BSO exposats a 90 minuts d'isquèmia i 6 hores de reperfusió. (n ≥ 3) \*P < .05 vs animals control no isquèemics; # P < .05 vs animals amb I/R.

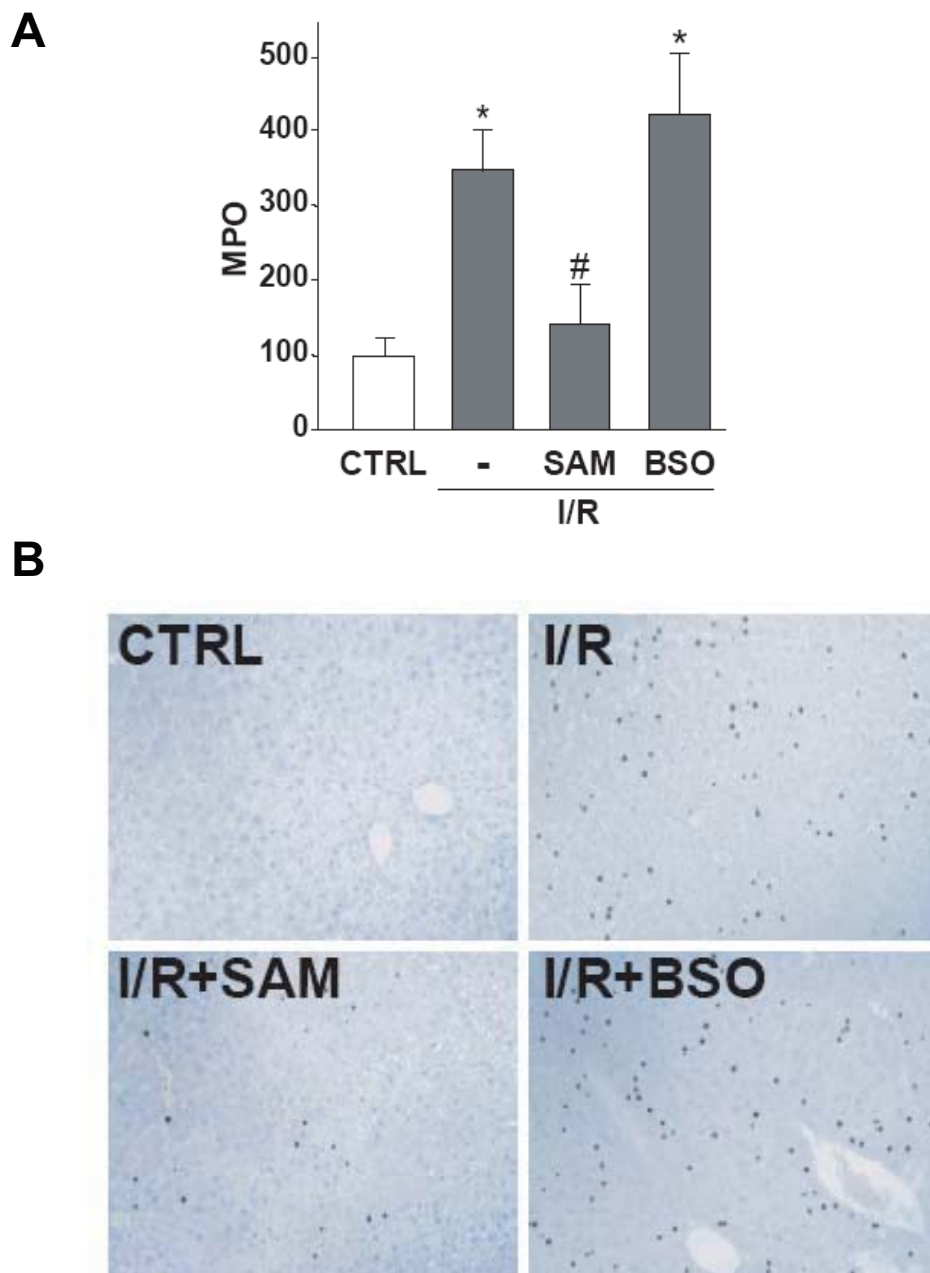
Consistent amb aquests resultats, els nivells de transaminases estan disminuïts en els animals tractats amb SAM [figura 37C], indicatiu de menor dany hepàtic tal i com s'observa en les tincions H&E [figura 38A] o TUNEL [figura 38B] comparats amb els no tractats. Contràriament es va observar un dany hepàtic massiu examinat amb ALT [figura 37C], H&E [figura 38A] i TUNEL [figura 38B] en els animals tractats amb BSO. A més, i de forma consistent amb els esmentats resultats, vàrem observar un efecte diferencial en el pretactament amb SAM vs BSO en el grau d'infiltració de neutròfils durant la I/R mesurat amb activitat enzimàtica mieloperoxidasa (MPO) [figura 39A] i immunohistoquímica [figura 39B]. Finalment, per a provar si l'efecte protector de l'administració de



SAM contra el dany hepàtic mediat per I/R era o no dependent de la biosíntesis de GSH, vàrem testar si el BSO suprimia l'efecte terapèutic del pretractament amb SAM, i vàrem observar que els nivells d'ALT en sèrum eren similars en el grup de ratolins tractats amb BSO sol, indicant que l'efecte beneficiós del SAM durant la I/R era dependent de l'increment en els nivells de GSH parenquimal.



**FIGURA 38. Tincions H&E (A) i TUNEL (B) de mostres de fetge.** Mostres de teixit hepàtic de ratolins tractats amb vehicle, SAM i BSO exposats a 90 minuts d'isquèmia i 6 hores de reperfusió.



**FIGURA 39.** La modulació dels nivells de GSH controla el dany i la infiltració de neutròfils induïda per I/R. Els ratolins que varen ser exposats a 90 minuts d'isquèmia varen ser tractats amb vehicle, SAM o BSO. La infiltració de neutròfils per activitat MPO (**A**) i immunohistoquímica (**B**) va ser analitzada 6 hores després de la reperfusió. No hi ha canvis en cap paràmetre en els animals tractats amb SAM o BSO sol. (n = 3) \* $P < .05$  vs ratolins control no isquèmics; #  $P < .05$  vs ratolins amb I/R.

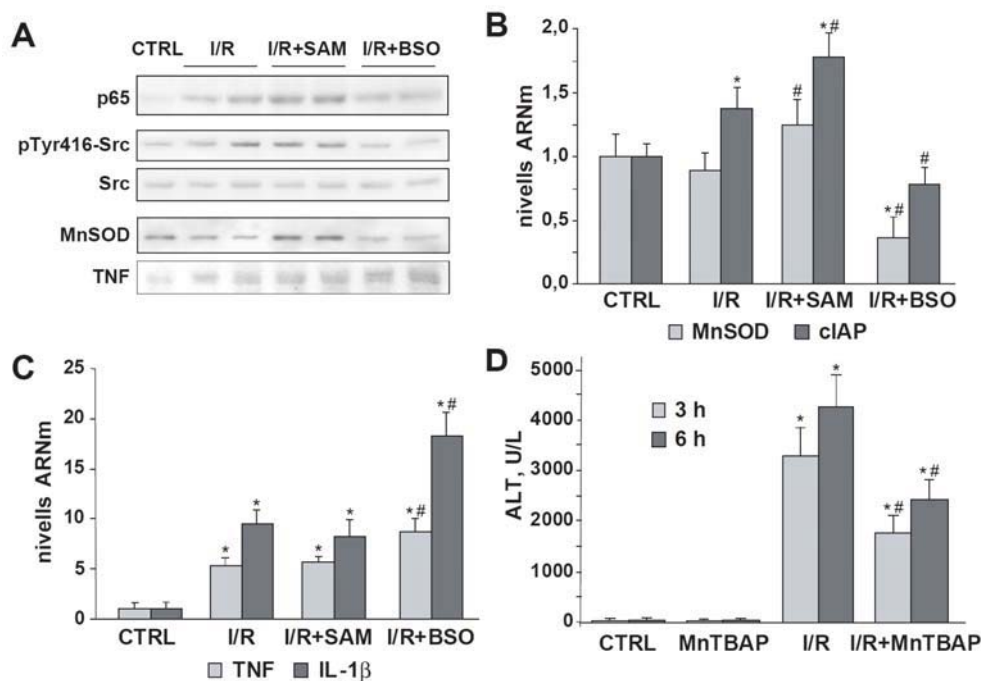
## **11. Efectes diferencials del SAM i el BSO en l'expressió de TNF/IL-1 $\beta$ i MnSOD/cIAP-2 durant la I/R**

Per a avaluar si els canvis en l'estat redox del fetge seguit de SAM i BSO influencien en el grau d'activació d'NF- $\kappa$ B durant la I/R, vàrem analitzar els nivells de p65, subunitat transactivadora de l'heterodímer d'NF- $\kappa$ B p50-p65 després d'una hora de reperfusió. Com s'observa a la figura 40A, la translocació nuclear de p65 induïda per I/R, incrementa en els ratolins tractats amb SAM, mentre que la disminució dels nivells de GSH en els animals tractats amb BSO, disminueix els nivells nuclears de p65 en ratolins exposats a I/R. A més, els nivells de fosforilació de Src després de 90 minuts d'isquèmia incrementen en els animals tractats amb SAM, mentre que l'administració de BSO redueix els nivells de fosfo-Src, apuntant de nou la fosforilació en tirosines de Src com a principal mecanisme involucrat en l'observada activació d'NF- $\kappa$ B. A més, els extractes totals de fetge després de 90 minuts d'isquèmia seguit de 6 hores de reperfusió, presentaven nivells més alts de la proteïna MnSOD en els ratolins tractats amb SAM, suggerint un increment en la síntesi d'aquest gen protector, mentre que el TNF era moderadament incrementat en els ratolins tractats amb BSO [figura 40A].

Seguidament, per a analitzar si aquests canvis en l'expressió de proteïnes era reflectit en els nivells d'ARNm, vàrem analitzar l'efecte de la modulació del GSH en l'expressió de gens dependents d'NF- $\kappa$ B seguit de I/R. Vàrem observar un increment significatiu en l'expressió de l'ARNm de cIAP i MnSOD després de l'administració de SAM, mentre que es va detectar una clara reducció en els ratolins amb nivells de GSH baixos després de la injecció de BSO [figura 40B]. De manera interessant, els nivells d'ARNm de TNF i IL-1 $\beta$  no es veuen afectats amb l'administració de SAM, tot i que aquests nivells incrementen amb el pretractament amb BSO abans de la I/R [figura 40C], suggerint que hi ha una regulació diferencial en l'expressió dels gens dependents d'NF- $\kappa$ B en cèl·lules parenquimals i no parenquimals. La MnSOD, la SOD mitocondrial dependent de  $\kappa$ B, té un rol rellevant en la protecció hepàtica contra diversos estímuls

hepatotòxics que indueixen estrès oxidatiu, com la I/R [213, 214]. En aquest context, nosaltres hem observat recentment que l'expressió de la MnSOD protegeix les cèl·lules d'hepatoma sota condicions severes de hipòxia [71]. Com que l'ARNm de la MnSOD incrementa en els animals tractats amb SAM, vàrem examinar si subministrant un mimètic de la MnSOD, MnTBAP, podíem reproduir la protecció observada en els ratolins tractats amb SAM contra el dany hepàtic induït per I/R. Com es veu, els animals tractats amb MnTBAP estaven protegits front l'exposició a I/R examinant els nivells sèrics d'ALT [figura 40D] així com les tincions d'H&E i TUNEL.

Aquestes dades per tant, suggereixen que estratègies enfocades a activar selectivament NF- $\kappa$ B en cèl·lules parenquimals pot ser de rellevància en la I/R hepàtica.



**FIGURA 40.** La recuperació dels nivells de GSH després de la I/R incrementa els nivells nuclears de p65 i la transcripció dels gens protectors. El mimètic de la SOD protegeix el fetge front el dany induït per I/R. Western blot representatiu de p65, p-Src i Src 1h després de la reperfusió (A) (n = 3). Nivells de proteïna MnSOD i TNF s'analitzaren a les 6h de reperfusió. Quantificació de l'ARNm dels gens dependents d'NF- $\kappa$ B protectors (B) i inflamatoris (C) en mostres de fetge de ratolins exposats a 90 minuts d'isquèmia i 6 hores de reperfusió i pretractats amb vehicle, SAM o BSO. Nivells d'ALT en sèrums de ratolins pretractats amb vehicle o MnTBAP i exposats a la I/R (D). (n = 3) \* $P < .05$  vs animals control no isquèemics; #  $P < .05$  vs ratolins amb I/R.

**DISCUSSIÓ**



En el **primer estudi** vàrem examinar el rol de l'esfingomielinasa àcida en l'homeòstasi de la ceramida i la seva contribució en el dany provocat per I/R hepàtica.

La generació de ceramida durant la I/R és transitòria degut a l'activació seqüencial de l'esfingomielinasa àcida, que genera ceramida a partir de la hidròlisi de l'esfingomielina, seguit de l'estimulació de la ceramidasa àcida, que catabolitza aquesta ceramida. Aquest patró dependent del temps en l'activació d'aquests enzims reguladors de la ceramida dóna lloc al pic de ceramida que observem durant la I/R. Aquestes observacions obren diverses qüestions en quant a com són estimulats aquests enzims durant la I/R i quines serien les conseqüències de la seva activació per la funció hepàtica en la I/R.

L'increment dels nivells de TNF, estimulat per les cèl·lules de Kupffer, juga un rol important en el dany hepàtic per I/R [45, 186, 187], i la mort hepatocel·lular que indueix el TNF és mediada en part per l'activació de l'enzim esfingomielinasa àcida [106, 123]. Durant la I/R nosaltres vàrem detectar increments ràpids en els nivells de TNF i vam postular que aquesta citocina podia contribuir a l'activació de l'esfingomielinasa àcida induïda per I/R. Això es va demostrar amb la pentoxifilina (PTX), una metil xantina inhibidora de la producció de TNF *in vivo* [176, 215] que prevenia l'activació de l'ASMasa i el consegüent increment en els nivells de ceramida observats durant la I/R.

El mecanisme d'activació de la ceramidasa àcida durant la I/R no està del tot clar. S'ha observat que la sobreexpressió de l'ACDasa en fibroblasts humans dóna lloc a una estimulació de l'ASMasa i aquesta pot ser coprecipitada amb l'ACDasa utilitzant anticossos anti-ceramidasa [216], indicant que hi ha interaccions físiques entre aquests dos enzims de pH òptim àcid.

Nosaltres no ens vàrem centrar en el rol de l'activació de l'ACDasa en la modulació del dany hepàtic durant la I/R, tot i que es podria esperar que per una deacilació de la ceramida, l'ACDasa generés esfingosina. I aquesta, podria ser metabolitzada a esfingosina-1-fosfat, un lípid bioactiu amb propietats antiapoptòtiques. En concordança amb això, s'ha mostrat que la sobreexpressió d'ACDasa prevé la mort cel·lular induïda per TNF en les cèl·lules L929 [217], al igual que la transfecció amb ceramidasa neutra

protegeix els hepatòcits de la mort cel·lular induïda per TNF via activació de l'ASMas.

La següent pregunta va ser si la ceramida senyalitzava mort hepatocel·lular i si el dany hepàtic per I/R podia ser modulats per la generació de ceramida.

El dany tissular provocat durant la I/R pot procedir per necrosi o per apoptosi, dues formes de mort cel·lular que són regulades per l'MPT [178, 218]. La sortida de citocrom c de la mitocòndria és un procés clau per a l'activació de caspasa-3 i la generació de l'apoptosoma. Tot i que la sortida de citocrom c que nosaltres vàrem observar durant la I/R semblava ser modesta, correlacionava exactament amb el grau d'activació de caspasa-3. Fins i tot en el cas del pretractament amb NOE on el grau de dany hepàtic estimat per la generació de transaminases (ALT) i les histologies era substancialment major comparat amb els ratolins tractats amb vehicle, el nivell de citocrom c al citosol és incrementat de 2 a aproximadament 3.5. Tot i que aquest increment es reflecteix en l'activació de caspasa-3, la contribució de l'apoptosi en el dany causat per I/R sembla ser relativament menor al que passa normalment en els hepatòcits aïllats. En canvi, la necrosi afecta de manera extensiva àrees de cèl·lules parenquimals consistent amb la generació massiva d'ALT en sèrum que reflecteix el trencament de membranes plasmàtiques. Tot això indica que la necrosi és la forma predominant de mort cel·lular en el dany produït per I/R [178]. En relació amb això, estudis recents en ratolins knockout de la ciclofilina D revelen el rol crític de l'MPT en la mort cel·lular necròtica en cor, fetge i cervell [218].

Per a examinar l'impacte de la ceramida en el dany hepàtic per I/R, vàrem inhibir l'ASMas i l'ACDasa abans de la cirurgia.

La imipramina, un antidepressiu tricíclic que inhibeix l'activitat de l'ASMas [123, 200] prevenia la generació de ceramida durant la reperfusió i disminuïa la mort hepatocel·lular. Malauradament, la utilització de ratolins knockout de l'ASMas no es va poder dur a terme, ja que aquests animals presentaven disfuncions pulmonars i una elevada sensibilitat a la isquèmia degut a l'acumulació d'esfingomielina en els seus pulmons [202]. Per a això vàrem realitzar la supressió de l'ASMas *in vivo* mitjançant ARNi. Vam observar reduccions en l'activació de l'ASMas i disminucions en la generació de ceramida i això



protegia el fetge del dany hepatocel·lular induït per I/R, de manera que verificava els resultats obtinguts amb la imipramina. A més vam veure que la pentoxifilina, un inhibidor de la producció de TNF que s'ha descrit que protegeix el fetge front I/R [45], prevenia l'activació de l'ASMasa i la conseqüent generació de ceramida per I/R [figura 17C]. En canvi, la inhibició de l'ACDasa provocava un increment del contingut de ceramida i potenciava el dany hepàtic induït per I/R. Al realitzar un estudi de supervivència vam constatar que el pretractament *in vivo* amb imipramina augmentava la supervivència dels ratolins sotmesos a I/R total hepàtica.

Estudis recents en mitocòndries aïllades indiquen que la ceramida indueix l'MPT i les espècies reactives d'oxigen [26, 123] implicant doncs que la generació de ceramida durant la I/R estimula l'MPT, amb el fenotip de mort hepatocel·lular modulada per la disminució del contingut d'adenosina trifosfat. La pregunta que se'ns va plantejar és com la ceramida senyalitzava a la mitocòndria i regulava la mort cel·lular dels hepatòcits durant la I/R. Vàrem descartar la implicació de la glucosilceramida i la generació de glicoesfingolípid (com el GD3) en el dany hepàtic per I/R. Consistent amb aquestes observacions, la I/R no estimulava la GCS, i per tant no incrementaven els nivells de glucosilceramida ni de GD3. A més, el PDMP, un inhibidor de la GCS, no protegia el fetge contra la I/R. Aquests resultats indiquen que tot i que la inducció de l'ASMasa per TNF té lloc en ambdós, hepatòcits aïllats i I/R hepàtica, no hi ha connexió entre l'ASMasa i la GCS.

Nosaltres vàrem considerar la possibilitat de que la ceramida senyalitzés a la mitocòndria per activació d'efectors com JNK [208, 209]. Les nostres dades indiquen primer que la I/R induïx la fosforilació de JNK, confirmant observacions prèvies [99], i segon, que la imipramina prevé l'activació de JNK. Per tant, la contribució de JNK al dany hepàtic per I/R podia ser mediat per la formació de ceramida induïda per l'ASMasa [figura 41]. D'acord amb aquests resultats, la potent activació de JNK (8 cops) per ASMasa exògena [219] ha estat descrita en hepatòcits primaris. A més, s'ha descrit la interacció de JNK amb la mitocòndria durant la mort cel·lular [94, 95], obrint la possibilitat de que el rol de JNK en el dany hepàtic per I/R pugui ser degut a les seves interaccions amb la mitocòndria. De totes maneres, el rol citotòxic de JNK ha

de ser atribuït no només a la seva interacció putativa amb la mitocondria sinó també amb l'activació d'altres dianes, incloent els membres BH3-only de la família de Bcl-2 com Bim, que pot ser regulat per mecanismes post-transcripcionals i post-translacionals [207, 220]. Nosaltres vam observar increments de BimL i de la fosforilació de BimL, una variant d'splicing de Bim normalment associada amb microtúbuls per interaccions amb la cadena lleugera 1 de la dineina que impedeix la seva interacció amb altres membres de la família de Bcl-2 [220]. La fosforilació de BimL a la treonina 56 per JNK deslliga a BimL dels microtúbuls, permetent la seva redistribució i unió a Bcl-2 [220]. Consistent amb aquest mecanisme, nosaltres vam observar la fosforilació de BimL i la seva translocació a la mitocondria durant la I/R, d'acord amb resultats anteriors en cèl·lules canceroses de pulmó [207]. També vam veure que aquest pas era suprimit per la inhibició de JNK (SP600125) o la inhibició de l'ASMas (imipramina) [figura 29D]. A més, Bak ha estat involucrat en el dany hepàtic per I/R de manera depenent de JNK [99], i per tant nosaltres no descartem la participació de membres de la família de proteïnes Bcl-2 en el procés d'I/R hepàtica.

Resumint, els nostres resultats indiquen que la modulació de la generació de ceramida per ASMas durant la I/R regula la via mitocondrial de mort hepatocel·lular per mitjà de l'activació de JNK i la subseqüent translocació mitocondrial de BimL [figura 41], suggerint que la modulació de la ceramida podria ser una aproximació terapèutica per a prevenir el dany hepàtic postisquèmic.

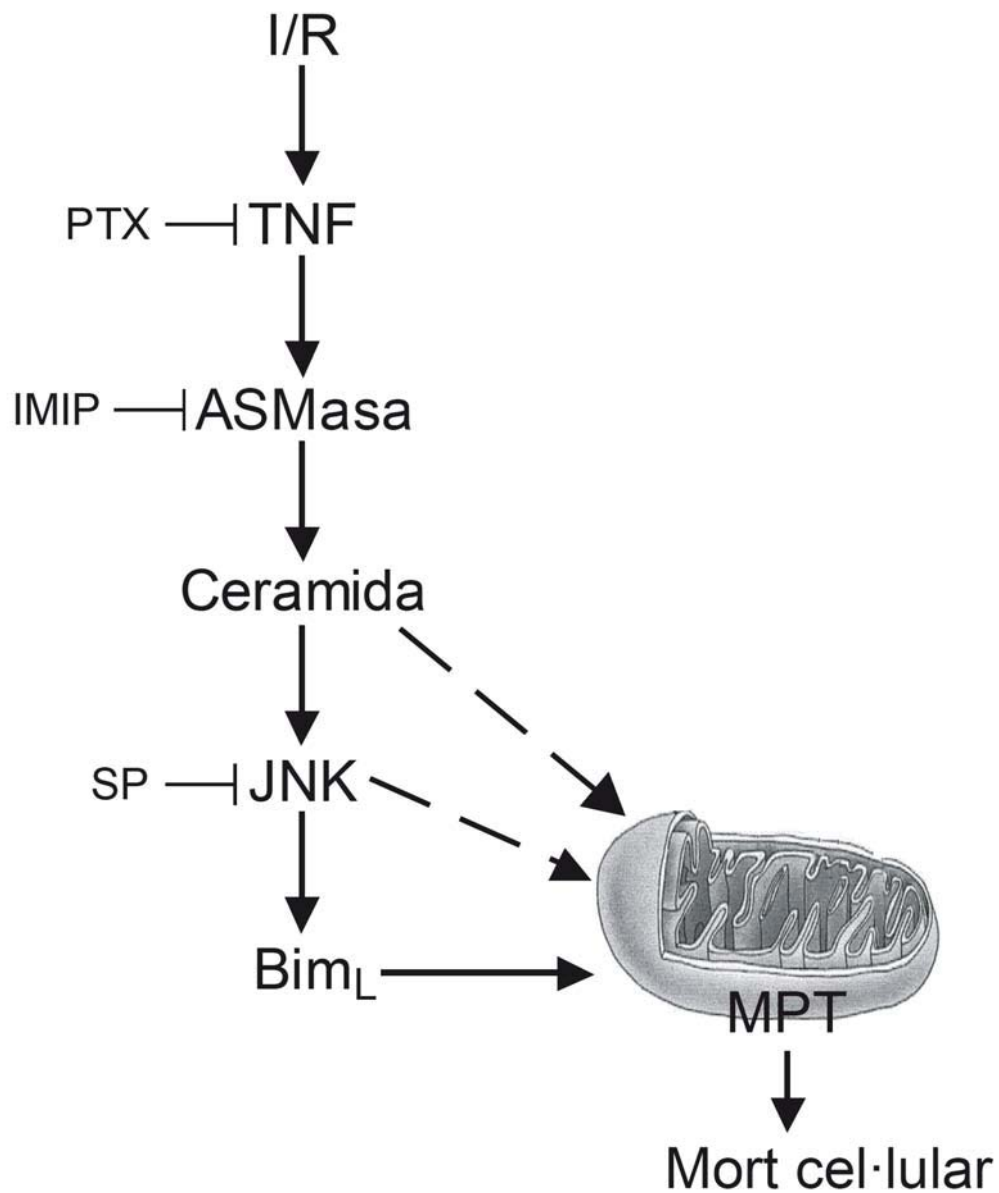


FIGURA 41. Diagrama esquemàtic resumint els resultats. La generació de ceramida durant la I/R senyalitza a la mitocòndria mitjançant l'activació de JNK i la subseqüent translocació de Bim<sub>L</sub> a la mitocòndria, culminant amb mort hepatocel·lular. La pentoxifilina (PTX) o imipramina (IMIP), que prevé l'activació d'ASMa, suprimeixen l'activació de JNK, i atenuen la mort cel·lular dependent de la mitocòndria.

En el **segon estudi** ens vàrem proposar analitzar el paper d'NF-κB en la isquèmia/reperfusió. Com a regulador de vies de inflamació i de supervivència, NF-κB participa tant en mecanismes protectors com en la generació de citocines inflamatòries, i el balanç d'aquests dos efectes controla finalment el grau de dany hepàtic durant la I/R.

Tot i que la senyalització d'NF-κB ha esdevingut una diana de potencial efecte terapèutic per controlar i mantenir la funció hepàtica després de la I/R, han estat reportats resultats en els quals ambdós l'activació i la inactivació d'NF-κB protegeixen contra el dany hepàtic per I/R [77, 84-86].

El nostre treball proposa que els efectes oposats d'NF-κB després de la I/R, determinats per mecanismes distintius en cèl·lules parenquimals i no parenquimals, controlen autònomament l'activació d'NF-κB que afecta a sets de gens separats [figura 42]. Els nostres resultats apunten el mecanisme d'activació d'NF-κB dependent de Src mediat per ROS com a via predominant que actua en els hepatòcits, i aquesta via és l'encarregada de la inducció dels gens protectors essencials en el manteniment de la funció del fetge. Per altra banda, en les cèl·lules no parenquimals, particularment en les cèl·lules de Kupffer, la inducció dels gens proinflamatoris κB depenents és més aviat degut a la fosforilació en serines i degradació proteasòmica d'IκB. Aquesta activació canònica d'NF-κB en cèl·lules de Kupffer, estimulada per I/R a través de lligands com el TNF o l'LPS, pot ser consistent amb la protecció del fetge observada en models de knockouts que tenen bloquejada aquesta senyalització mediada per receptor [30, 77, 84, 187] o després d'una inactivació de les cèl·lules de Kupffer [31, 34, 188].

Per altra banda, la generació de ROS després de la I/R és responsable de la inducció de la fosforilació de Src, activació d'NF-κB i transcripció dels gens protectors κB-dependents en els hepatòcits, com la MnSOD. Això és consistent amb resultats previs indicant que la hipòxia indueix ROS a la mitocondria, i aquests juguen un rol important de senyalització en l'activació de Src [71]. Tot i així, períodes més llargs de isquèmia indueixen una producció massiva de ROS i generació de GSSG, que antagonitzen a NF-κB, reflectit per una disminució dels nivells nuclears de p65 i una disminució en la transcripció dels gens de supervivència κB depenents com la MnSOD o CIAP-2. En concordança amb

observacions prèvies, l'activació d'NF- $\kappa$ B es produeix en un rang determinat de concentracions de GSSG [221].

En paral·lel amb aquests efectes de la translocació nuclear de p65, vàrem observar una regulació dual de la fosforilació de Src durant la generació de ROS mediada per la I/R. Mentre que aquesta activació durant les primeres fases de la I/R concorda amb resultats previs en hipòxia [71], la disminució en la fosforilació de Src a fases més avançades pot reflectir l'activació de tirosinofosfatasas, tot i que això resta per establir. Aquest rol dual dels ROS en la senyalització de la I/R, depenent de la duració de la isquèmia, és consistent amb l'observació de que la supressió de l'estrès oxidatiu generat durant el preconditionament isquèmic és suficient per a cancel·lar el mecanisme protector dut a terme pel preconditionament, incloent la sobreexpressió de la MnSOD [222, 223].

La MnSOD és un enzim crític en la protecció cel·lular com a primera línia de defensa contra la generació de l'anió superòxid, i d'acord amb aquesta funció s'ha posicionat la MnSOD com a una molècula decisiva contra el dany isquèmic en diferents òrgans, incloent el fetge [214, 224-226].

Tot i que nosaltres no vam analitzar quina era la font de generació de ROS (mitocondrial vs extramitocondrial) durant isquèmies perllongades, estudis previs apunten a la mitocondria com a la major font de ROS durant la I/R o la hipòxia [71, 227]. L'eliminació de l'anió superòxid per la MnSOD donarà lloc a peròxid d'hidrogen, i aquest, necessita ser detoxificat pel cicle redox del GSH a la matriu mitocondrial. Si hi ha un mal funcionament de la GSH peroxidasa, o de la GSH reductasa, o els nivells de GSH estan limitats, pot resultar en una acumulació elevada de peròxid d'hidrogen. De forma interessant, el tractament amb SAM prevé la disminució de GSH no només en el citosol via la seva conversió a cisteïna en la via de la transulfuració [211], sinó també incrementant els nivells de GSH mitocondrial pel transport del GSH citosòlic [127, 147].

Ja que durant la I/R es genera un elevat nivell d'estrès oxidatiu, han estat provades diferents estratègies antioxidants i s'ha vist que són útils contra el dany de l'òrgan mediat per I/R [159, 194, 226-230]. Tot i que les MATs han estat recentment descrites en cèl·lules no parenquimals [231], la conversió de SAM a GSH en el fetge només l'hem observat en els hepatòcits, i això representa

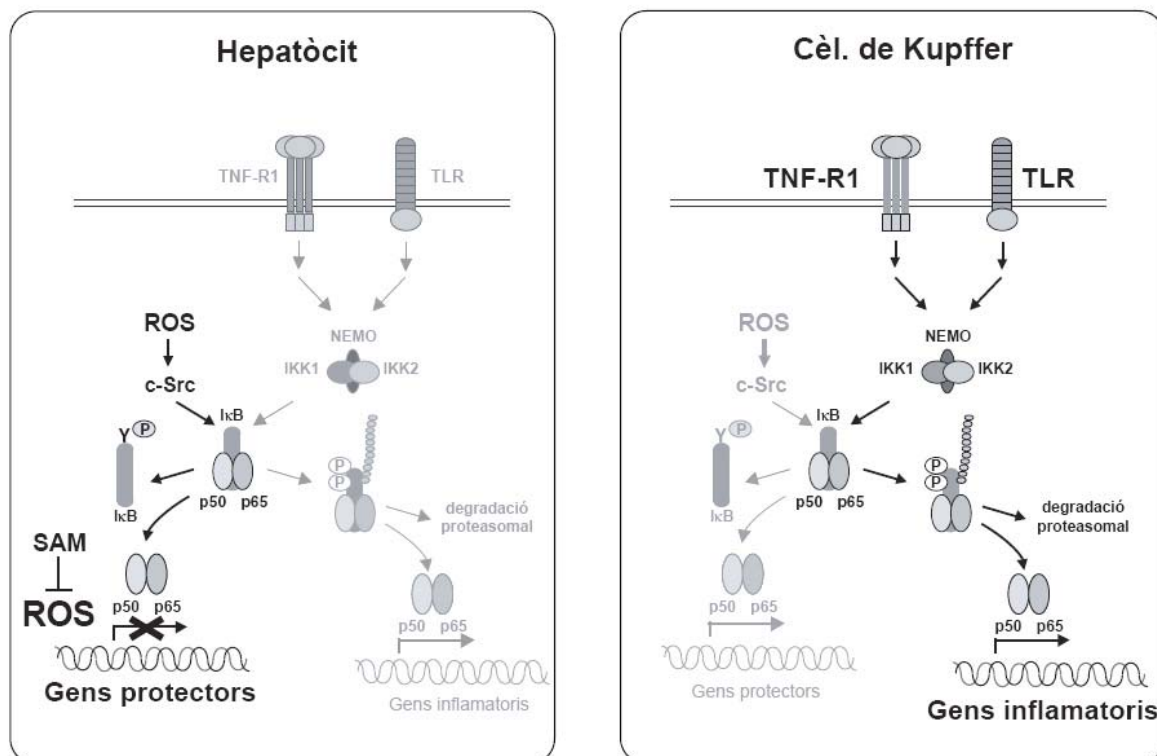
selectivament una implicació diferencial dels ROS en la regulació dels gens NF- $\kappa$ B depenents en cèl·lules parenquimals i no parenquimals i en el seu rol en el dany per I/R.

Per tant, en cèl·lules no parenquimals, durant temps llargs d'isquèmia, l'increment en la transcripció de citocines inflamatòries  $\kappa$ B depenents, no estan afectats per l'administració de SAM, però estan significantment reduïts per una inactivació de cèl·lules de Kupffer. De manera interessant, la protecció hepàtica obtinguda després del tractament amb clorur de gadolini, és atribuïda quasi exclusivament a una reducció de la generació de citocines inflamatòries, sense induir cap declinació en les nivells dels gens protectors  $\kappa$ B depenents com la MnSOD, originat principalment en les cèl·lules parenquimals.

Tot això implica una regulació i/o modulació minuciosa d'NF- $\kappa$ B degut a la seva complexitat, diversos mecanismes d'activació i heterogeneïtat cel·lular. Vàries modificacions posttranslacionals de p65 causades per diferents estímuls, particularment fosforilació en serines i acetilació, poden afectar a la seva afinitat per dominis específics localitzats en el promotor dels gens corresponents [232, 233]. També s'ha proposat que els gens regulats per NF- $\kappa$ B poden ser dividits en dos grups depenent dels seus requeriments en les modificacions de la cromatina per l'expressió [233]. Particularment, la remodelització de la cromatina i l'acetilació d'histones s'ha mostrat que faciliten la transcripció de la MnSOD en resposta a TNF [234]. No obstant, els nostres resultats poden ajudar a apreciar que la senyalització d'NF- $\kappa$ B en el fetge pot ser analitzada en cada tipus cel·lular particular, i s'ha de tenir en compte aquest comportament autònom. Tot i que en aquest sentit, Takahashi et al van descriure una activació dual d'NF- $\kappa$ B durant el dany hepàtic mediat per I/R en fred [235] diferenciant una fase primerenca i una tardana en l'activació d'NF- $\kappa$ B, aquests investigadors no van explorar si poblacions selectives de cèl·lules contribuïen al rol divergent d'NF- $\kappa$ B en la isquèmia en fred.

Resumint, l'activació d'NF- $\kappa$ B mediada per Src en els hepatòcits és induïda per la generació de ROS després de l'exposició a I/R, i la síntesis depenent d'NF- $\kappa$ B de proteïnes de defensa durant períodes curts d'isquèmia pot estar en risc si s'apliquen estratègies encaminades a disminuir la producció de ROS. En canvi, quan el temps d'isquèmia és prolongat, la transcripció de gens protectors

depenents d'NF- $\kappa$ B pot ser compromesa. Amb aquestes premisses, antagonitzar les espècies reactives d'oxigen produïdes en els hepatòcits durant períodes llargs de isquèmia per estratègies antioxidants pot preservar els nivells dels gens protectors, com la MnSOD, i protegir la integritat del fetge.



**FIGURA 42. Diagrama mostrant les diferents vies de senyalització d'NF- $\kappa$ B induït per I/R.** En els hepatòcits, NF- $\kappa$ B controla els gens protectors després de la isquèmia via un mecanisme mediat per Src sensible a ROS. Tot i així, una elevada producció de ROS en isquèmies més severes o per una deficiència en la capacitat de contrarestar la producció d'espècies oxidants, com en els animals amb GSH disminuït, redueix la transcripció dels gens depenents d'NF- $\kappa$ B, i la activació mediada per Src és inefectiva. En canvi, les cèl·lules de Kupffer són principalment les responsables de la producció de proteïnes inflamatòries depenents d'NF- $\kappa$ B i no mostren evidències de reducció front als increments de la producció de ROS. De fet, els nivells dels ARNm dels gens inflamatoris incrementa a temps d'isquèmia més llargs.





## **CONCLUSIONS**



A partir dels resultats obtinguts en el present treball d'investigació s'extreuen les següents conclusions:

**ESTUDI 1. *Paper clau de l'esfingomielinasa àcida en el dany hepàtic induït per isquèmia/reperfusió.***

- 1.1. Durant la I/R hi ha acumulació transitòria de ceramida degut a l'activació seqüencial de l'esfingomielinasa àcida seguit de l'activació de la ceramidasa àcida.
- 1.2. La generació de ceramida via ASMasa activa JNK provocant la fosforilació i translocació de Bim<sub>L</sub> a la mitocòndria.
- 1.3. Tant l'administració d'inhibidors farmacològics de l'esfingomielinasa àcida (imipramina), com la regulació a la baixa d'aquest enzim amb ARNs d'interferència disminueixen el dany hepàtic causat per I/R.

Per tant, **la generació de ceramida via ASMasa contribueix a la mort hepatocel·lular induïda per I/R mitjançant un mecanisme apoptòtic dependent de la mitocòndria, i estratègies encaminades a disminuir la generació de ceramida poden protegir front el dany hepàtic causat per I/R.**

**ESTUDI 2. *Les espècies reactives d'oxigen provoquen dany hepàtic per una inactivació d'NF-κB en períodes llargs d'isquèmia/reperfusió.***

- 2.1. L'activació hepàtica d'NF-κB observada després de la I/R és sensible a l'estat redox cel·lular.
- 2.2. Durant la I/R hi ha una activació diferencial dels gens κB dependents segons el tipus cel·lular.

-En els hepatòcits, el mecanisme d'activació d'NF-κB és dependent de Src. Src és activat pels ROS i fosforila IκB-α en residus tirosina permetent una translocació de p65 al nucli i una subseqüent transactivació de gens protectors κB dependents.

-En les cèl·lules de Kupffer, hi ha una activació dels gens proinflamatoris  $\kappa$ B depenents degut a la fosforilació en serines i degradació proteasòmica d'I $\kappa$ B- $\alpha$ .

- 2.3. Isquèmies llargues indueixen estrès oxidatiu a l'hepatòcit disminuint l'activació d'NF- $\kappa$ B i l'expressió de gens antiapoptòtics com la MnSOD i cIAP.
- 2.4. La inactivació de les cèl·lules de Kupffer durant la I/R, disminueix la producció de gens proinflamatoris  $\kappa$ B depenents com TNF i IL-1 $\beta$ .

Per tant, **estratègies antioxidants específiques encaminades a disminuir la producció de radicals als hepatòcits pot contribuir no només a reduir l'impacte directe dels radicals en la generació de dany hepàtic, sinó també en el manteniment de l'activació dels gens protectors  $\kappa$ B depenents durant la isquèmia/reperfusió.**

## **BIBLIOGRAFIA**



**BIBLIOGRAFIA**

1. Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG, *Histología funcional. Texto y atlas en color*. Editorial Jims (2a edició), 1987.
2. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J, *Biología molecular de la célula*. Editorial Omega (2a edició), 1992.
3. Friedman SL, *Minireview. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury*. The Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(4): p. 2247-2250.
4. Ham A, Corak D, *Tratado de histología*. Editorial Salvat (3a edició), 1988.
5. Leslie P, Gartner J, Hitt L, *Histología texto y atlas*. Editorial McGraw-Hill (2a edició), 1997.
6. Jungermann K, Katz N, *Functional specialization of different hepatocyte populations*. *Physiol Rev*, 1989. **69**: p. 708-764.
7. Toledo-Pereya L, Simmons RL, Najarian JS, *Protection of the ischemic liver by donor pretreatment before transplantation*. *Am F Surg*, 1975. **129**: p. 513-517.
8. Lemasters J, Ji S, Thurman RG, *Centrilobular injury following hypoxia in isolated, perfused rat liver*. *Science*, 1981. **213**: p. 661-3.
9. Farmer D, Amersi F, Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW, *Current status of ischemia reperfusion injury in the liver*. *Transplant Rev*, 2000. **14**: p. 106-126.
10. Belzer F, Southard JH, *Principles of solid-organ preservation by cold storage*. *Transplantation*, 1988. **45**: p. 673-676.
11. Jaeschke H, Farhood A, *Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver*. *Am J Physiol*, 1991. **260**: p. G355-62.
12. Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, *Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia*. *Am J Physiol*, 1993. **264**: p. G801-9.
13. Fondevila C, Busuttil R, Kupiec-Weglinski JW, *Hepatic ischemia/reperfusion injury, a fresh look*. *Experimental and Molecular Pathology*, 2003. **74**: p. 86-93.
14. Xia Z, Horton JW, Zhao PY, *Effects of ischemia on intra-cellular sodium and phosphates in the in vivo rat liver*. *J Appl Physiol*, 1996. **81**: p. 1395-403.
15. Bond JM, Chacon E, Herman B, *Intracellular pH and calcium homeostasis during the pH paradox of reperfusion injury to cultured neonatal rat cardiac myocytes*. *Am J Physiol*, 1993. **265**: p. C129-37.

16. Curin R, Gores GT, Thurman RG, *Protection by acidotic pH against anoxic cell killing in perfused rat liver: evidence for a pH paradox*. FASEB J, 1991. **5**: p. 207-10.
17. Gores F, Nimenan AL, Wray BE, *Intracellular pH during "chemical hypoxia" in cultured rat hepatocytes. Protection by intracellular acidosis against the onset of cell death*. J Clin Invest, 1989. **83**: p. 386-96.
18. Lichtman S, Lemasters JJ, *Role of cytokines and cytokine-producing cells in reperfusion injury to the liver*. Sem Liv Dis, 1999. **19**: p. 171-87.
19. Griffiths E, Halestrap AP, *Protection by cyclosporin A of ischemia/reperfusion induced damage in isolated rat hearts*. J Mol Cardiol, 1993. **25**: p. 1461-9.
20. Jaeschke H, *Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver*. Chem Biol Interact, 1991. **79**: p. 115-136.
21. McCord J, *Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury*. N Engl J Med, 1985. **312**: p. 159-163.
22. Adamson G, Billings R, *Tumor necrosis factor induced oxidative stress in isolated mouse hepatocytes*. Arch Biochem Biophys, 1992. **294**: p. 223-229.
23. Gudz TI, Tserng KY, Hoppel CL, *Direct inhibition of mitochondrial respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide*. J Biol Chem, 1997. **272**(39): p. 24154-8.
24. Kroesen BJ, Pettus B, Luberto C, Busman M, Sietsma H, de Leij L, Hannun YA, *Induction of apoptosis through B-cell receptor cross-linking occurs via de novo generated C16-ceramide and involves mitochondria*. J Biol Chem, 2001. **276**(17): p. 13606-14.
25. Ardail D, Popa I, Alcantara K, Pons A, Zanetta JP, Louisot P, Thomas L, Portoukalian J, *Occurrence of ceramides and neutral glycolipids with unusual long-chain base composition in purified rat liver mitochondria*. FEBS Lett, 2001. **488**(3): p. 160-4.
26. García-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Fernández-Checa JC, *Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione*. J Biol Chem, 1997. **272** (17): p. 11369-77.
27. Atalla S, Toledo-Pereya LH, McKenzie GH, Cederna JP, *Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers*. Transplantation, 1985. **40**: p. 584-590.
28. Steinhorn D, Cerra FB, *Comparative effects of lipopolysaccharide on newborn versus adult rat hepatocyte and nonparenchymal cell co-cultures*. Crit. Care Med, 1997. **25**: p. 121-127.
29. Decker K, *Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells)*. Eur. J. Biochem, 1990. **192**: p. 245-261.
30. Shen X, Ke B, Zhai Y, Gao F, Tsuchihashi S, Lassman CR, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW, *Absence of toll-like receptor 4 (TLR4) signaling in*



- the donor organ reduces ischemia and reperfusion injury in a murine liver transplantation model.* Liver Transpl, 2007 **13(10)**: p. 1435-43.
31. Tsung A, Hoffman RA, Izuishi K, Critchlow ND, Nakao A, Chan MH, Lotze MT, Geller DA, Billiar TR, *Hepatic ischemia/reperfusion injury involves functional TLR4 signaling in nonparenchymal cells.* J Immunol, 2005 **175(11)**: p. 7661-8.
  32. Rizzardini M, Zappone M, Villa P, Gnocchi P, Sironi M, Diomede L, Meazza C, Monshouwer M, Cantoni L, *Kupffer cell depletion partially prevents hepatic heme oxygenase 1 messenger RNA accumulation in systemic inflammation in mice: role of interleukin 1 $\beta$ .* Hepatology, 1998. **27**: p. 103-10.
  33. Shiratori Y, Ohmura K, Hikiba Y, *Hepatocyte nitric oxide production is induced by Kupffer cells.* Dig Dis Sci, 1998. **43**: p.173-175.
  34. Jang J, Moritz W, Graf R, Clavien PA, *Preconditioning with death ligands FasL and TNF-alpha protects the cirrhotic mouse liver against ischaemic injury.* Gut, 2008. **57**: p. 492-499.
  35. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D, *Improved graft survival after renal transplantation in the United states, 1988 to 1996.* N Engl J Med, 2000. **342**: p. 605-612.
  36. Suzuki S, Toledo-Pereya LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D, *Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine.* Transplantation, 1993. **55**: p. 1265-1272.
  37. Clavien P, Harvey PR, Sanabria JR, Cywes R, Levy GA, Strasberg SM, *Lymphocyte adherence in the reperfused rat liver: mechanisms and effects.* Hepatology, 1993. **17**: p. 131-142.
  38. Zwacka R, Zhang Y, Halldorson J, Schlossberg H, Dudus L, Engelhardt JF, *CD4(+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver.* J Clin Invest, 1997. **100**: p. 279-289.
  39. Le Morine O, Louis H, Demols A, Desalle F, Demoor F, Quertin-mont E, Goldman M, Deviere J, *Cold liver ischemia-reperfusion injury critically depends on liver T cells and is improved by donor pretreatment with interleukin 10 in mice.* Hepatology, 2000. **31**: p. 1266-1274.
  40. Baker S, Reddy EP, *Modulation of life and death by the tumor necrosis superfamily.* Oncogene, 1998. **17**: p. 3261-70.
  41. Czaja M, Xu J, Alt E, *Prevention of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by soluble tumor necrosis factor receptor.* Gastroenterology, 1995. **108**: p. 1849-54.
  42. Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Tiegs G, Germann PG, Wendel A, *Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models.* Am J Pathol, 1995. **146**: p. 1220-34.

43. Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M, *Up-regulation of oxygen-derived free radicals by interleukin-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury*. Transplantation, 1997. **64**: p. 1398-403.
44. Wanner G, Ertel W, Muller P, *Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation*. Shock, 1996. **5**: p. 34-40.
45. Rudiger H, Clavien PA, *Tumor necrosis factor alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver*. Gastroenterology, 2002. **122**: p. 202-10.
46. Song Z, Uriarte S, Sahoo R, Chen T, Barve S, Hill D, McClain C, *S-adenosylmethionine (SAME) modulates interleukin-10 and interleukin-6, but not TNF, production via the adenosine (A2) receptor*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1743(3)**: p. 205-13.
47. Lentsch A, Yoshidome H, Kato A, Warner RL, Cheadle WG, Ward PA, Edwards MJ, *Requirement for interleukin-12 in the pathogenesis of warm hepatic ischemia/reperfusion injury in mice*. Hepatology, 1999. **30**: p. 1448-1453.
48. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, *Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant for liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion*. Am J Pathol, 1994. **145**: p. 1421-31.
49. Vollmar B, Glasz J, Post S, *Role of microcirculatory derangements in manifestation of portal triad cross-clamping-induced hepatic reperfusion injury*. J Surg Res, 1996. **60**: p. 49-54.
50. Koepffel T, Thies JC, Schemmer P, *Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia/reperfusion of the rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular blood flow*. J Hepatol, 1997. **27**: p. 163-9.
51. Pannen B, Al-Adili F, Bauer M, *Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat*. Hepatology, 1998. **27**: p. 755-64.
52. Clemens MG, *Nitric oxide in liver injury*. Hepatology, 1999. **30**: p. 1-5.
53. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT, *Hepatic ischemia-reperfusion injury*. Am F Surg, 2001. **181**: p. 160-6.
54. Hur GM, Ryu YS, Yun HY, Jeon BH, Kim YM, Seok JH, Lee JH, *Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF-kappa B*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **261**: p. 917-22.
55. Dhar D, Yamanoni A, Ohmori H, *Modulation of endothelin and nitric oxide: a rational approach to improve canine hepatic microcirculation*. Hepatology, 1998. **28**: p. 782-8.
56. Kohli V, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA, *Calpain mediates ischemic injury of the liver through modulation of apoptosis and necrosis*. Gastroenterology, 1999. **116**: p. 168-178.
57. Crenese D, Gugenheim J, Hornoy J, Tornieri K, Laurens M, Cambien B, Lenegrata G, Cursio R, De Souza G, Auberger P, Heurteaux C, Rossi B, Schmid-Alliana A, *Protein kinase activation by warm and cold hypoxia-*

- reoxygenation in primary-cultured rat hepatocytes-JNK(1)/SAPK(1) involvement in apoptosis.* Hepatology, 2000. **32**: p. 1029-1036.
58. Bradham C, Stachlewitz RF, Gao W, Qian T, Jayadev S, Jenkins G, Hannun Y, Lemasters JJ, Thurman RG, Brenner DA, *Reperfusion after liver transplantation in rats differentially activates the mitogen-activated protein kinases.* Hepatology, 1997. **25**: p. 1128-1135.
59. Sen R, Baltimore DI, Cell 47, *Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-Kappa B by a posttranslational mechanism.* Cell, 1986. **47 (6)**: p. 921-8.
60. Karin M, and Lin A, *NF-kappaB at the crossroads of life and death.* Nat Immunol, 2002. **3**: p. 221-227.
61. Pahl H, *Activation and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors.* Oncogene, 1999. **18**: p. 6835-6866.
62. Muller C, Harrison SC, *The structure of the NF-kappa B p50: DNA-complex: a starting point for analysing the Rel family.* FEBS Lett, 1995. **369(1)**: p. 113-7.
63. Hayden M, Ghosh S, *Signaling to NF-kB* Genes Devel, 2004. **8**: p. 2195-2224.
64. Druker, B, Neumann M, Okuda K, Franza BR, Griffin JD, *Rel is rapidly tyrosinephosphorylated following granulocyte-colony stimulating factor treatment of human neutrophils.* J. Biol. Chem, 1994. **269(7)**: p. 5387-90.
65. Koong A, Chen EY, Giaccia AJ, *Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorilation of I kappa B alpha on tyrosine residues.* Cancer Res, 1994. **54(6)**: p. 1425-30.
66. Imbert V, Rupec RA, Livolsi A, Pahl HL, Traenckner EB, Mueller-Dieckmann C et al, *Tyrosine phosphorylation of Ikb-alpha activates NF-kappaB without proteolytic degradation of Ikb-alpha.* Cell, 1996. **86**: p. 787-798.
67. Abu-Amer Y, Dowdy SF, Ross FP, Clohisy JC, Teitelbaum SL, *TAT fusion proteins containing tyrosine 42-deleted IkappaBalpna arrest osteoclastogenesis.* J. Biol. Chem, 2001. **276**: p. 30499-30503.
68. Al-Ramadi BK, Welte T, Fernandez-Cabezudo MJ, Galadari S, Dittel B, Fu XY, Bothwell AL, *The Src-protein tyrosine kinase Lck is required for IL-1 mediated costimulatory signaling in Th2 cells.* J. Immunol, 2001. **167**: p. 6827-6833.
69. Liu R, Aupperle K, Terkeltaub R, *Src family protein tyrosine kinase signaling mediates monosodium urate crystal-induced IL-8 expression by monocytic THP-1 cells.* J. Leukoc. Biol, 2001. **70**: p. 961-968.
70. Livolsi A, Busuttil V, Imbert V, Abraham RT, Peyron JF, *Tyrosine phosphorylation-dependent activation of NFkB. Requirement of p56LCK and ZAP-70 protein tyrosine kinases.* Eur. J. Biochem, 2001. **268**: p. 1580-1515.
71. Lluis JM, Buricchi F, Chiarugi P, Morales A, Fernández-Checa JC, *Dual role of mitochondrial reactive oxygen species in hypoxia signaling:*

- Activation of nuclear factor-kB via c-SRC and oxidant-dependent cell death.* Cancer Res, 2007. **67 (15)**: p. 7368-7377.
72. Singh S, Darnay BG, Aggarwal BB, *Site-specific tyrosine phosphorylation of I $\kappa$ B-alpha negatively regulates its inducible phosphorylation and degradation.* J Biol Chem, 1996. **271**: p. 31049-31054.
73. Jaeschke H, Tucson AZ., *Activation and function of hepatocyte NF-kB in postischemic liver injury.* Hepatology Eslwhere, 2005. **42(1)**: p. 216-218.
74. Fan C, Li Q, Ross D, Engelhardt JF, *Tyrosine phosphorylation of I $\kappa$ Balpha activates NF-kappaB through a redox-regulated and c-Src dependent mechanism following hypoxia/reoxygenation.* J Biol Chem, 2003. **278**: p. 2072-2080.
75. Zwacka RM, Zhang Y, Zhou W, Halldorson J, Engelhardt JF, *Ischemia/reperfusion injury in the liver of BALB/c mice activates AP-1 and nuclear factor kappaB independently of I $\kappa$ B degradation.* Hepatology, 1998. **28**: p. 1022-1030.
76. Zwacka RM, Zhou W, Zhang Y, Darby CJ, Dudus L, Halldorson J, Oberley L, Engelhardt JF, *Redox gene therapy for ischemia/reperfusion injury of the liver reduces AP1 and NF-kappaB activation.* Nat Med, 1998. **4**: p. 698-704.
77. Luedde T, Assmus U, Wutefeld T, Meyer zu Vilsendorf A, Roskams T, Schmidt-Supprian M, Rajewsky K, Brenner DA, Manns MP, Pasparakis M, Trautwein C, *Deletion of IKK2 in hepatocytes does not sensitize these cells to TNF-induced apoptosis but protects from ischemia/reperfusion injury.* J Clin Invest, 2005. **115**: p. 849-859.
78. Fan C, Li Q, Zhang Y, Liu X, Luo M, Abbot D, Zhou W, Engelhardt JF, *I $\kappa$ Balpha and I $\kappa$ Bbeta possess injury context-specific functions that uniquely influence NF-kB induction and inflammation.* J Clin Invest, 2004. **113**: p. 746-755.
79. Koong A, Chen EY, Giaccia AJ, *Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues.* Cancer Res, 1994. **54(6)**: p. 1425-30.
80. Sato H, Sato M, Kanai H, Uchiyama T, Iso T, Ohyama Y, Sakamoto H, Tamura J, Nagai R, Kurabayashi M, *Mitochondrial reactive oxygen species and c-Src play a critical role in hypoxic response in vascular smooth muscle cells.* Cardiovascular Research, 2005. **67**: p. 714-22.
81. Lou H, Kaplowitz N, *Glutathione depletion down-regulates tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activity via I $\kappa$ B kinase-dependent and -independent mechanisms.* J Biol Chem, 2007. **282**: p. 29470-81.
82. Luedde T, Trautwein C, *Intracellular survival pathways in the liver.* Liver Int, 2006. **26**: p. 1163-74.
83. Schwabe RF, Brenner DA, *Mechanisms of liver injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK and ROS pathways.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**: p. G583-G589.

84. Beraza N, Lüde T, Assmus U, Roskams T, Vander Borgh S, Trautwein C, *Hepatocyte-specific IKK gamma/NEMO expression determines the degree of liver injury*. Gastroenterology, 2007. **132**: p. 2504-17.
85. Kuobi S, Okaya T, Schuster R, Blanchard J, Denenberg A, Wong HR, et al, *Hepatocyte NF-kappaB activation is hepatoprotective during ischemia-reperfusion injury and augmented ischemic hypothermia*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(G201-7).
86. Suetsugu H, Iimuro Y, Uehara T, Nishio T, Harada N, Yoshida M, Hatano E, Son G, Fujimoto J, Yamaoka Y, *Nuclear factor-kappaB inactivation in the rat liver ameliorates short term total warm ischaemia/reperfusion injury*. Gut, 2005. **54**: p. 835-42.
87. Chaisson M, Brooling JT, Ladiges W, Tsai S, Fausto N, *Hepatocyte-specific inhibition of NF-kB leads to apoptosis after TNF treatment, but not after partial hepatectomy*. J Clin Invest, 2002. **110**: p. 193-202.
88. Liu H, Lo CR, Czaja MJ, *NF-kB inhibition sensitizes hepatocytes to TNF-induced apoptosis through a sustained activation of JNK and c-Jun*. Hepatology, 2002. **35**: p. 772-778.
89. Whitmarsch A, Davis RJ, *Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase transduction pathway*. J Mol Med, 1999. **74**: p. 589-607.
90. Chan E, Winston BW, Jarpe MB, Wynes MW, Riches DW, *Preferential activation of the p46 isoform of JNK/SAPK in mouse macrophages by TNF alpha*. Proc Natl Acad Sci USA, 1997. **94**: p. 13169-13174.
91. Bendinelli P, Piccoletti R, Maroni P, Bernelli-Zazzera A, *The MAP kinase cascades are activated during post-ischemic liver reperfusion*. Fed Eur Biochem Soc Lett, 1996. **398**: p. 193-197.
92. Davis R, *Signal transduction by JNK group of MAP kinases*. Cell, 2000. **103**: p. 239-252.
93. Li C, Jackson RM, *Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**: p. C227-C241.
94. Kharbana S, Saxena S, Yoshida K, Pandey P, Kaneki M, Wang Q, Cheng K, Chen YN, Campbell A, Sudha T, Yuan ZM, Narula J, Weichselbaum R, Nalin C, Kufe D, *Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage*. J Biol Chem, 2000. **275**: p. 322-327.
95. Aoki H, Kang PM, Hampe J, Yoshimura K, Noma T, Matsuzaki M, Izumo S, *Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun-N-terminal kinase in adult cardiac myocytes*. J Biol Chem, 2002. **277**: p. 10244-10250.
96. Deng X, Xiao L, Lang W, Gao F, Ruvolo P, May Jr WS, *Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase*. J Biol Chem, 2001. **276**: p. 23681-23688.
97. Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ, *Requirement of JNK for stress-induced*

- activation of the cytochrome c-mediated death pathway*. Science, 2000. **288**: p. 870-874.
98. Luedde T, Liedtke C, Manns MP, Trautwein C, *Losing balance: cytokine signaling and cell death in the context of hepatocyte injury and hepatic failure*. Eur. Cytokine Netw, 2002. **13**: p. 377-383.
99. Uehara T, Bennet B, Sakata ST, Satoh Y, Bilter GK, Westwick JK, Brenner DA, *JNK mediates hepatic ischemia reperfusion injury*. J Hepatol, 2005. **42**: p. 850-9.
100. Scheid M, Woodgett JR, *PKB/Akt: functional insights from genetic models*. Nat Rev, 2001. **2**: p. 760-768.
101. Toth A, Kovacs K, Deres P, Halmosi R, Czopf L, Hanto K, Kalai T, Hideg K, Sumegi B, Toth K, *Impact of a novel cardioprotective agent on the ischaemic-reperfusion induced Akt kinase activation*. Biochem Pharmacol, 2003. **66**: p. 2263-2272.
102. Izuishi K, Tsung A, Hossain MA, Fujiwara M, Wakabayashi H, Masaki T, Billiar TR, Maeta H, *Ischemic preconditioning of the murine liver protects through the Akt kinase pathway*. Hepatology, 2006. **44(3)**: p. 573-80.
103. Datta S, Brunet A, Greenberg ME, *Cellular survival: a play in three Akts*. Genes Devel, 1999. **13**: p. 2905-2927.
104. Kolesnick R, *The therapeutic potencial of modulating the ceramida/sphingomyelin pathway*. J Clin Invest, 2002. **110**: p. 3-8.
105. Pettus B, Chalfant CE, Hannun YA, *Ceramida in apoptosis: an overview and current perspectives*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1585**: p. 114-25.
106. Kolesnick R, Kronke M, *Regulation of ceramide production and apoptosis*. Annu. Rev. Physiol, 1998. **60**: p. 643-665.
107. Schissel S, Keesler GA, Schuchman EH, Williams KJ, Tabas I, *The cellular trafficking and zinc dependence of secretory and lysosomal sphingomyelinase, two products of the acid sphingomyelinase gene*. J. Biol. Chem, 1998. **273**: p. 18250.
108. Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, Spiegel S, *Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate*. Nature, 1996. **381**: p. 800-3.
109. Milstien S, Spiegel S, *Targeting sphingosine-1-phosphate: a novel avenue for cancer therapeutics*. Cancer Cell, 2006. **9**: p. 148-50.
110. Ogretmen B, Hannun YA, *Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment*. Nat. Rev. Cancer, 2004. **4**: p. 604-16.
111. Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, Cavalli AL, Moreno KM, Matteo RG, Garland WA, Lu Y, Yu S, Hall HS, Kundra V, Mills GB, Sabbadini RA, *Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages*. Cancer Cell, 2006. **9**: p. 225-38.
112. Van Echten G, Sandhoff K, *Ganglioside metabolism*. J Biol Chem, 1993. **268**: p. 5341-4.

113. García-Ruiz C, Colell A, Paris R, Fernández-Checa JC, *Direct interaction of GD3 ganglioside with mitochondria generates reactive oxygen species followed by mitochondrial permeability transition, cytochrome c release, and caspase activation*. FASEB J, 2000. **14**: p. 847-58.
114. Colell A, García-Ruiz C, Roman JC, Ballesta A, Fernández-Checa JC, *Ganglioside GD3 enhances apoptosis by suppressing the nuclear factor-kappa B-dependent survival pathway*. FASEB J, 2001. **15**: p. 1068-70.
115. Paris R, Morales A, Coll O, Sánchez-Reyes A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC, *Ganglioside GD3 sensitizes human hepatoma cells to cancer therapy*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49870-6.
116. Valaperta R, Chigorno V, Basso L, Prinetti A, Bresciani R, Preti A, Miyagi T, Sonnino S, *Plasma membrane production of ceramide from ganglioside GM3 in human fibroblasts*. FASEB J, 2006. **20**: p. 1227-9.
117. Gulbins E, Grassme H, *Ceramide and cell death receptor clustering*. Biochim. Biophys. Acta (Molecular and Cell Biology of Lipids), 2002. **1585**: p. 139-45.
118. Ruvolo P, *Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites*. Pharmacol. Res, 2003. **47**: p. 383-92.
119. Bose R, Verheij M, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick R, *Ceramida in apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals*. Cell, 1995. **82**: p. 405-14.
120. Lozano J, Menendez S, Morales A, Wagman R, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick R, *Cell autonomous apoptosis defects in acid sphingomyelinase knockout fibroblast*. J Biol Chem, 2001. **276**: p. 442-8.
121. Grullich C, Sullards MC, Fuks Z, Merrill AH Jr, Kolesnick R, *CD95 (Fas/APO-1) signals ceramide generation independent of the effector stage of apoptosis*. J Biol Chem, 2000. **275**: p. 8650-6.
122. Lozano J, Morales A, Fuks Z, Tilly JL, Schuchman E, Gulbins E, Kolesnick R, *Niemann-Pick Disease versus acid sphingomyelinase deficiency*. Cell Death Differ, 2001. **8**: p. 100-2.
123. García-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Calvo M, Enrich C, Fernández-Checa JC, *Defective TNF-mediated apoptosis and liver damage in acid sphingomyelinase KO mice*. J Clin Invest, 2003. **111**: p. 197-208.
124. Carracedo A, Lorente M, Egia A, Blazquez C, Garcia S, Giroux V, Malicet C, Villuendas R, Gironella M, González-Feria L, Piris MA, Iovanna JL, Guzmán M, Velasco G, *The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells*. Cancer Cell, 2006. **9**: p. 301-12.
125. Ghafourifar P, Schenk U, Klein SD, Richter C, *Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation*. J. Biol. Chem, 1999. **274**: p. 31185-8.

126. Quillet-Mary A, Jaffrezou JP, Mansat V, Bordier C, Naval J, Laurent G *Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis.* J Biol Chem, 1997. **272 (34)**: p. 21388-95.
127. Marí M, Colell A, Morales A, Pañeda C, Varela-Nieto I, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC, *Acidic sphingomyelinase downregulates the liver-specific methionine adenosyltransferase 1A, contributing to tumor necrosis factor-induced lethal hepatitis.* J Clin Invest, 2004. **113**: p. 895.
128. De Maria R, Lenti L, Malisan F, d'Agostino F, Tomassini B, Zeuner A, Rippo MR, Testi R, *Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis.* Science, 1997. **277**: p. 1652-5.
129. Colell A, Morales A, Fernández-Checa JC, García-Ruiz C, *Ceramide generated by acidic sphingomyelinase contributes to tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis in human colon HT-29 cells through glycosphingolipids formation. Possible role of ganglioside GD3.* FEBS Lett, 2002. **526**: p. 135-41.
130. Copani A, Melchiorri D, Caricasole A, Martini F, Sale P, Carnevale R, Gradini R, Sortino MA, Lenti L, De Maria R, Nicoletti F, *Beta-amyloid-induced synthesis of the ganglioside GD3 is a requisite for cell cycle reactivation and apoptosis in neurons.* J Neurosci, 2002. **22**: p. 3963-8.
131. Morita Y, Perez GI, Paris F, Miranda SR, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Xie Z, Reed JC, Schuchman EH, Kolesnick RN, Tilly JL, *Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy.* Nat Med, 2000. **6**: p. 1109-14.
132. Strelow A, Bernardo K, Adam-Klages S, Linke T, Sandhoff K, Krönke M, Adam D, *Overexpression of acid ceramidase protects from TNF-induced cell death.* J Exp Med, 2000. **192**: p. 601-12.
133. Pitson S, Xia P, Leclercq TM, Moretti PA, Zebol JR, Lynn HE, Wattenberg BW, Vadas MA, *Phosphorylation-dependent translocation of sphingosine kinase to the plasma membrane drives its oncogenic signalling.* J. Exp. Med, 2005. **201**: p. 49-54.
134. Wiegmann K, Schutze S, Machleidt T, Whitte D, Kronke, *Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinase in tumor necrosis factor signaling.* Cell, 1994. **78**: p. 1005-15.
135. Alessenko AV, Galperin EI, Dudnik LB, Korobko VG, Mochalova ES, Platonova LV, Shingarova LN, Shono NI, Shupik MA et al, *Role of tumor necrosis factor alpha and sphingomyelin cycle activation in the induction of apoptosis by ischemia/reperfusion of the liver.* Biochemistry (Mosc), 2002. **67**: p. 1347-1355.
136. Han D Hanawa N, Saberi B, Kaplowitz N, *Mechanisms of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **291 (1)**: p. G1-7.
137. Meister A, Yaniguchi N, Higashi T, Sakamoto Y, *Glutathione centennial.* San Diego Academic Press, 1989: p. 3-21.



138. Griffith O, Meister A, *Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine*. J. Biol. Chem, 1979. **254**: p. 7558-60.
139. Kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens M, *The regulation of hepatic glutathion*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1985. **25**: p. 715-44.
140. Meister A, *Glutathione metabolism and its selective modification*. J. Biol. Chem, 1988. **263(33)**: p. 17250-8.
141. Meister A, *Glutathione metabolism*. Methods Enzymol. Review, 1995. **251**: p. 3-7.
142. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND, *Glutathione metabolism and its implications for health*. J Nutr, 2004. **134(3)**: p. 489-92.
143. Cooper A, *Biochemistry of sulfur-containing amino acids*. Annu. Rev. biochem, 1983. **52**: p. 187-222.
144. Wahllander A, Soboll A, Sies H, *Hepatic mitochondrial and cytosolic glutathione content and the subcellular distribution of GSH-S-transferases*. FEBS Lett, 1975. **97**: p. 138-140.
145. García-Ruiz C, Morales A, Colell A, Ballesta A, Rodés J, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC, *Effect of chronic ethanol feeding on glutathione and functional integrity of mitochondria in periportal and perivenous rat hepatocytes*. J. Clin. Invest, 1994. **94**: p. 193-201.
146. Fernández-Checa JC, Kaplowitz N, García-Ruiz C, Colell A, Miranda M, Mari M, Ardite E, Morales A, *GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect*. Am J Physiol, 1997. **273(1 Pt 1)**: p. G7-17.
147. Fernández-Checa JC, Kaplowitz N, *Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **204 (3)**: p. 263-73.
148. Fernández-Checa JC, Kaplowitz N, García-Ruiz C, Colell A, *Mitochondrial glutathione: importance and transport* Semin Liver Dis, 1998. **18(4)**: p. 389-401.
149. Macho A, Hirsch T, Marzo I *Glutathione depletion is an early and calcium elevation is a late event of thymocyte apoptosis*. J. Immunol, 1997. **158** p. 4612-19.
150. Fernández-Checa JC, Ookhtens M, Kaplowitz N, *Effects of chronic ethanol feeding on rat hepatocytic glutathione. Relationship of cytosolic glutathione to efflux and mitochondrial sequestration*. J. Clin. Invest 1989. **83(4)**: p. 1247-52.
151. Colell A, García-Ruiz C, Miranda M, Ardite E, Mari M, Morales A, Corrales F, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC, *Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes hepatocytes to tumor necrosis factor*. Gastroenterology, 1998. **115**: p. 1541-51.
152. Armstrong J, Jones DP *Glutathione depletion enforces the mitochondrial permeability transition and causes cell death in Bcl-2 overexpressing HL60 cells*. FASEB J, 2002. **16(10)**: p. 1263-5.

153. Hirata Y, Taguchi T, Nakao M, Yamada T, Hirose R, Suita S, *The relationship between the adenine nucleotide metabolism and the conversion of xanthine oxidase enzyme system in ischemia-reperfusion of the rat small intestine*. J Pediatr Surg, 1996. **23**: p. 1002-1008.
154. Sun C, Zhang XY, Sheard PW, Mabuchi A, Wheatley AM, *Change in mitochondrial membrane potential is the key mechanism in early warm hepatic ischemia-reperfusion injury*. Microvascular Research, 2005. **70**: p. 102-110.
155. Ross D, *Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. Mechanisms of free radical induced toxicity and glutathione-dependent protection*. Pharmacol. Ther, 1988. **37**: p. 231-49.
156. Deneke S, Fanburg BL, *Regulation of cellular glutathione*. Am J Physiol, 1989. **257**: p. L163.
157. Kurokawa T, Kobayashi H, Nonami T, Harada A, Nakao A, Takagi H, *Mitochondrial glutathione redox and energy producing function during liver ischemia and reperfusion*. Journal of Surgical Research, 1996. **66**: p. 1-5.
158. Arias-Díaz J, Vara E, García C, Villa N, Rodríguez JM, Ortiz P, Balibrea JL, *S-adenosylmethionine protects hepatocytes against the effects of cytokines*. J Surg Res, 1996 **62(1)**: p. 79-84.
159. Schauer R, Gerbes AL, Vonier D, Meissner H, Michl P, Leiderer R, Schildberg FW, Messmer K, Bilzer M, *Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia*. Ann Surg, 2004. **239(2)**: p. 220-31.
160. Jeon B, Lee SM, *S-adenosylmethionine protects post-ischemic mitochondrial injury in rat liver*. Journal of Hepatology, 2001. **34**: p. 395-401.
161. Lemasters J, *The mitochondrial permeability transition and the calcium, oxygen and pH paradoxes: one paradox after another*. Cardiovascular Research, 1999. **44**: p. 470-473.
162. Guicciardi M, Gores GJ, *Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury*. Gut, 2005. **54**: p. 1024-1033.
163. Barnhart B, Petter ME, *The TNF receptor 1: a split personality complex*. Cell, 2003. **114**: p. 148-150.
164. Adrain C, Martin SJ, *The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**: p. 390-397.
165. Sprick M, Walczak H, *The interplay between the Bcl-2 family and the death receptor-mediated apoptosis*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1644**: p. 125-32.
166. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S, *Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death*. Cell 2003. **112**: p. 481-490.
167. Martinou JC, Green DR. *Breaking the mitochondrial barrier*. Nat Rev Mol Cell Biol 2001. **2**: p. 63-67.

168. Crompton M, Virji S, Ward JM, *Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore*. Eur. J. Biochem. 1998. **258**: p. 729-735.
169. Kerr J, Wyllie AH, Currie AR, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**: p. 239-257.
170. Majino G, Joris I, *Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death*. Am J Pathol, 1995. **146**: p. 3-15.
171. McDonnell JM, Fushman D, Milliman CL, Korsmeyer SJ, Cowburn D *Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists*. Cell, 1999. **96**: p. 625-634
172. von Ahsen O, Renken C, Perkins G, Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, *Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release*. J Cell Biol, 2000. **150**: p. 1027-1036.
173. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH, *Proapoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c*. Cell Death Differ, 2000. **7**: p. 1166-1173.
174. Gujral J, Bucci T, Farhood A, Jaeschke H, *Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis?* Hepatology, 2001. **33**: p. 397-405.
175. Clavien P, Rudiger HA, Selzner M, *Mechanisms of hepatocyte death after ischemia: apoptosis versus necrosis*. Hepatology, 2001. **33**: p. 1555-1556.
176. Rudiger HA, Kang KJ, Sindram D, Riehle HM, Clavien PA, *Comparison of ischemic preconditioning intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver*. Ann Surg, 2002. **235**: p. 400-407.
177. Selzner N, Rudiger HA, Selzner N, Thomas DW, Sindram D, Clavien PA, *Bcl-2 overexpression in transgenic mice protects against ischemia and reperfusion injury of the liver*. J Hepatol, 2002. **36**: p. 218-225.
178. Jaeschke H, Lemasters JJ, *Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury*. Gastroenterology, 2003. **125 (4)**: p. 1246-57.
179. Lemasters J, *Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis*. Am J Physiol, 1999. **276**(1 Pt 1): p. G1-G6.
180. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ, *Apoptosis and Necrosis in the Liver: A Tale of Two Deaths?* Hepatology, 2006. **43**: p. S31-S44.
181. Bilzer M, Gerbes A, *Preservation injury of the liver. Mechanisms and novel therapeutic strategies*. J Hepatol, 2000. **32**: p. 508-515.
182. Carini R, Albano E, *Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning*. Gastroenterology, 2003. **125**: p. 1480-1491.

183. Iñiguez M, Berasain C, Martinez-Ansó E, Bustos M, Fortes P, Pennica D, Avila MA, Prieto J, *Cardiotrophin-1 defends the liver against ischemia-reperfusion injury and mediates the protective effect of ischemic preconditioning*. J Exp Med, 2006. **203(13)**: p. 2809-15.
184. Izuishi K, Tsung A, Hossain MA, Fujiwara M, Wakabayashi H, Masaki T, Billiar TR, Maeta H, *Ischemic preconditioning of the murine liver protects through the Akt kinase pathway*. Hepatology, 2006. **44 (3)**: p. 573-580.
185. Banga N, Homer-Vanniasinkam GA et al, *Ischemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver*. Br J Surg, 2005. **92**: p. 528-538.
186. Colletti LM, Remick DG, Burthc GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA *Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat*. J Clin Invest, 1990. **85**: p. 1936-1943.
187. Teoth N, Field J, Sutton J, Farrell G, *Dual role of tumor necrosis factor-alpha in hepatic ischemia-reperfusion injury: studies in tumor necrosis factor-alpha gene knockout mice*. Hepatology, 2004. **39**: p. 412-421.
188. Bailey S, Reinke LA, *Antioxidants and gadolinium chloride attenuate hepatic parenchymal and endothelial cell injury induced by low flow ischemia and reperfusion in perfused rat livers*. Free Radic Res, 2000. **32**: p. 497-506.
189. Mathias P, Morre DJ, *Subcellular distribution and biosynthesis of rat liver gangliosides*. Biochim Biophys Acta, 1987. **921(3)**: p. 599-614.
190. Inayat-Hussain SH, Couet C, Cohen GM, Cain K, *Processing/activation of CPP32-like proteases is involved in transforming growth factor beta1-induced apoptosis in rat hepatocytes*. Hepatology, 1997. **25(6)**: p. 1516-26.
191. Quintern LE, Sandhoff K, *Human acid sphingomyelinase from human urine*. Methods Enzymol, 1991. **197**: p. 536-40.
192. Strelow A, Bernardo K, Adam-Klages S, Linke T, Sandhoff K, Krönke M, Adam D, *Overexpression of acid ceramidase protects from tumor necrosis factor-induced cell death*. J Exp Med, 2000. **192(5)**: p. 601-12.
193. Veldman RJ, Mita A, Cuvillier O, Garcia V, Klappe K, Medin JA, Campbell JD, Carpentier S, Kok JW, Levade T, *The absence of functional glucosylceramide synthase does not sensitize melanoma cells for anticancer drugs*. FASEB J, 2003 **17(9)**: p. 1144-6.
194. Marí M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballeria J, Fernande A, Fernández-Checa JC, García-Ruiz C, *Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas- mediated steatohepatitis*. Cell Metab, 2006. **4**: p. 185-98.
195. Uchiyama M, Mihara M, *Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test*. Analytical biochemistry, 1978. **86**: p. 271-278
196. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF, *Quantitive assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assesment of*

- inflammation in rat and hamster models*. Gastroenterology, 1984. **87**: p. 1344-1350.
197. Fernández-Checa JC, García-Ruiz C, Ookhtens M, Kaplowitz N, *Impaired uptake of glutathione by hepatic mitochondria from chronic ethanol-fed rats. Tracer kinetic studies in vitro and in vivo and susceptibility to oxidant stress*. J Clin Invest, 1991. **87**(2): p. 397-405.
198. Tietze F, *Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues*. Anal Biochem, 1969. **27**: p. 502-522.
199. Chomczynski P, Sacchi N, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**: p. 156-159.
200. Hurwitz R, Ferlinz K, Sandhoff K, *The tricyclic antidepressant desipramine causes proteolytic degradation of lysosomal sphingomyelinase in human fibroblasts*. Biol Chem Hoppe Seyler, 1994. **375**: p. 447-450.
201. Sugita M, Williams M, Durlancy JT, Moser HW, *Ceramidase and ceramide synthesis in human kidney and cerebellum: description of a new alkaline ceramidase*. Biochim Biophys Acta, 1975. **398**: p. 125-31.
202. Ikegami M, Dhami R, Schuchman EH, *Alveolar lipoproteinosis in an acid sphingomyelinase-deficient mouse model of Niemann-Pick disease*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **284**: p. L518-L525.
203. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J, *RNA interference targeting Fas protects mice from fulminate hepatitis*. Nat Med, 2003. **9**: p. 347-351.
204. Zender L, Hutker S, Liedtke C, Tillmann HK, Zedner S, Mundt B, Waltemathe M, Gosling T, Flemming P, Malek NP, Trautwein C, Manns MP, Kuhnel F, Kubicka S, *Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice*. Proc Natl Acad Sci USA, 2003. **100**: p. 7797-7802.
205. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA, *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. Nature, 2001. **413**: p. 732-738.
206. Morales A, Colell A, Mari M, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC, *Glycosphingolipids and mitochondria: role in apoptosis and disease*. Glycoconj J, 2004. **20**: p. 579-588.
207. Kurinna S, Tsao CC, Nica AE, Jiffar T, Ruvolo PP, *Ceramide promotes apoptosis in lung cancer-derived A549 cells by a mechanism involving c-Jun NH2-terminal kinase*. Cancer Res, 2004. **64**: p. 7852-7856.
208. Verhei M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, Birrer MJ, Szabo E, Zon LI, Kyriakis JM, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick RN, *Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis*. Nature, 1996. **380**: p. 75-79.

209. Westwick J, Bielawska AE, Dbaibo G, Hannun YA, Brenner DA, *Ceramide activates stress-activated protein kinases*. J Biol Chem, 1995. **270**: p. 22689-22692.
210. Bennet B, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakat ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW, *SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of c-Jun N-terminal kinase*. Proc Natl Acad Sci USA, 2001. **98**: p. 13681-13686.
211. Finkelstein J, *Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine*. Clin Chem Lab Med, 2007. **45**: p. 1694-9.
212. Shimuru-Saito K, Horikawa S, Kojima N, Shiga J, Senoo H, Tsukada K, *Differential expression of S-adenosylmethionine synthetase isoenzymes in different cell types of rat liver*. Hepatology, 1997. **26**: p. 424-31.
213. Urakami H, Abe Y, Grisham MB, *Role of active metabolites of oxygen and nitrogen in partial liver transplantation: lessons learned from reduced-size liver ischaemia and reperfusion injury*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007. **34**: p. 912-9.
214. Wu T, Khoo NH, Zhou F, Day BJ, Parks DA, *Decreased hepatic ishemia-reperfusion injury by manganese-porphyrin complexes*. Free Radic Res, 2007. **41**: p. 127-34.
215. Schmidt-Choudhury A, Furuta G, Lavigne J, Galil S, Wershil B, *The regulation of tumor necrosis factor-alpha production in murine mast cells: pentoxifylline or dexamethasone inhibits IgE-dependent production of TNF-alpha by distinct mechanisms*. Cell Immunol, 1996. **171**: p. 140-146.
216. He X, Okino N, Dhimi R, Dagan A, Gatt S, Schulze H, Sandhoff K, Schuchman EH, *Purification and characterization of recombinant, human acid ceramidase: catalytic reactions and interactions with acid sphingomyelinase*. J Biol Chem, 2003. **278**: p. 32978-32986.
217. Strelow A, Bernardo K, Adam-Klages S, Linke T, Sandhoff K, Kronke M et al, *Overexpression of acid ceramidase protects from TNF-induced cell death*. J Exp Med, 2000. **192**: p. 601-12.
218. Baine C, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinka H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkentin JD, *Loss of cyclophilin D reveals a critical role of mitochondrial permeability transition in cell death*. Nature, 2005. **434**: p. 658-662.
219. Gupta S, Natarajan R, Payne SG, Sruder EJ, Spiegel S, Dent P, Hylemon PB, *Deoxycholic acid activates c-Jun-N-terminal Kinase pathway via FAS receptor activation in primary hepatocytes. Role of acidic sphingomyelinase-mediated ceramide generation in FAS receptor activation*. J Biol Chem, 2004. **279**(7): p. 5821-5828.
220. Ley R, Ewings KE, Hadfield K, Cook SJ, *Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK*. Cell Death Differ, 2005. **12**: p. 1008-1014.
221. Dröge W, Schulze-Osthoff K, Mihm S, Galter D, Schenk H, Eck HP, Roth S, Gmünder H, *Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology*. FASEB J, 1994. **8**: p. 1131-1138.

222. Rehman H, Connor HD, Ramshesh VK, Theruvath TP, Mason RP, Wright GL, Lemasters JJ, Zhong Z, *Ischemic preconditioning prevents free radical production and mitochondrial depolarization in small-for-size rat liver grafts*. *Transplantation*, 2008. **85**: p. 1322-1331.
223. Rüdiger HA Graf R, Clavien PA, *Sub-lethal oxidative stress triggers the protective effects of ischemic preconditioning in the mouse liver*. *J Hepatol*, 2003. **39**: p. 972-977.
224. Chen Z, Siu B, Ho YS, Vincent R, Chua CC, Hamdy RC, Chua BH, *Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice*. *J Mol Cell Cardiol* 1998. **30**: p. 2281-2289.
225. Kim G, Kondo T, Noshita N, Chan PH, *Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals*. *Stroke* 2002. **33**: p. 809-915.
226. Saba H, Batinic-Haberle I, Munusamy S, Mitchell T, Lichti C, Megyesi J, MacMillan-Crow LA, *Manganese porphyrin reduces renal injury and mitochondrial damage during ischemia/reperfusion*. *Free Radic Biol Med* 2007. **42**: p. 1571-1578.
227. Szeto H, *Mitochondria-targeted cytoprotective peptides for ischemia-reperfusion injury*. *Antiox Redox Signal*, 2008. **10**: p. 601-619.
228. Grattagliano I, Vendemiale G, Lauterburg BH, *Reperfusion injury of the liver: role of mitochondria and protection by glutathione ester*. *J Surg Res* 1999. **86**: p. 2-8.
229. Ozaki M, Nakamura M, Teraoka S, Ota K, *Ebselen, a novel anti-oxidant compound, protects the rat liver from ischemia-reperfusion injury*. *Transpl Int* 1997. **10**: p. 96-102.
230. Sener G, Tosun O, Sehirli AO, Kaçmaz A, Arbak S, Ersoy Y, Ayanoğlu-Dülger G, *Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion*. *Life Sci*, 2003. **72**: p. 2707-2718.
231. Shimizu-Saito K, Horikawa S, Kojima N, Shiga J, Senoo H, Tsukada K, *Differential expression of S-adenosylmethionine synthetase isoenzymes in different cell types of rat liver*. *Hepatology*, 1997. **26**: p. 424-31.
232. Hayden M, Ghosh S, *Shared principles in NF-kappaB signaling*. *Cell*, 2008. **132**: p. 344-362.
233. Natoli G, Sacconi S, Bosisio D, Marazzi I, *Interactions of NF-kappaB with chromatin: the art of being at the right place at the right time*. *Nat Immunol*, 2005. **6**: p. 439-445.
234. Guo Z, Boekhoudt GH, Boss JM, *Role of the intronic enhancer in tumor necrosis factor-mediated induction of manganese superoxide dismutase*. *J Biol Chem*, 2003. **278**: p. 23570-23578.
235. Takahashi Y, Ganster RW, Gambotto A, Shao L, Kaizu T, Wu T, Yagnik GP, Nakao A, Tsoulfas G, Ishikawa T, Okuda T, Geller DA, Murase N, *Role of NF-kappaB on liver cold ischemia-reperfusion injury*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002. **283**: p. G1175-1184.





**ANNEX**



Els resultats inclosos en la present tesi varen ser utilitzats per als articles:

**Llacuna L, Marí M, García-Ruiz C, Fernandez-Checa JC, Morales A. *Critical role of acidic sphingomyelinase in murine hepatic ischemia-reperfusion injury*. Hepatology. 2006 Sep;44(3):561-72.**

**Llacuna L, Marí M, Lluís JM, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC, Morales A. *Reactive oxygen species mediate liver injury through parenchymal NF-κB inactivation in prolonged ischemia/reperfusion*. American Journal of Pathology, 2009.**



# Critical Role of Acidic Sphingomyelinase in Murine Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury

Laura Llacuna, Montserrat Marí, Carmen Garcia-Ruiz, José C. Fernandez-Checa, and Albert Morales

The molecular mechanisms of hepatic ischemia/reperfusion (I/R) damage are incompletely understood. We investigated the role of ceramide in a murine model of warm hepatic I/R injury. This sphingolipid induces cell death and participates in tumor necrosis factor (TNF) signaling. Hepatic ceramide levels transiently increased after the reperfusion phase of the ischemic liver in mice, because of an early activation of acidic sphingomyelinase (ASMase) followed by acid ceramidase stimulation. *In vivo* administration of an ASMase inhibitor, imipramine, or ASMase knockdown by siRNA decreased ceramide generation during I/R, and attenuated serum ALT levels, hepatocellular necrosis, cytochrome c release, and caspase-3 activation. ASMase-induced ceramide generation activated JNK resulting in Bim<sub>L</sub> phosphorylation and translocation to mitochondria, as the inhibition of ASMase by imipramine prevented these events. In contrast, blockade of ceramide catabolism by N-oleylethanolamine (NOE), a ceramidase inhibitor, enhanced ceramide levels and potentiated I/R injury compared with vehicle-treated mice. Pentoxifylline treatment prevented TNF upregulation and ASMase activation. Furthermore, 9 of 11 mice treated with imipramine survived 7 days after total liver ischemia, compared with 4 of 12 vehicle-treated mice, whereas 8 of 8 NOE-treated mice died within 2 days of total liver ischemia. **In conclusion**, ceramide generated from ASMase plays a key role in I/R-induced liver damage, and its modulation may be of therapeutic relevance. *Supplementary material for this article can be found on the HEPATOLOGY website (<http://interscience.wiley.com/jpages/0270-9139/suppmat/index.html>). (HEPATOLOGY 2006;44:561-572.)*

Hepatic ischemia/reperfusion (I/R) damage, which can occur in diverse settings including liver transplantation, trauma, hemorrhagic shock, or liver surgery, is a serious clinical complication

that may compromise liver function because of extensive hepatocellular loss. The mechanisms responsible for hepatic I/R injury are not well understood despite the identification of several intercellular and molecular mechanisms involved in the necrotic and apoptotic death of hepatocytes. For instance, recruitment and activation of inflammatory cells (CD4<sup>+</sup> T lymphocytes), as well as Kupffer cells and platelet adhesion in the sinusoidal lining, have been involved in sinusoidal endothelial cell death and hepatic I/R injury.<sup>1-4</sup> Molecular events include nuclear factor kappaB (NF-κB) activation, tumor necrosis factor (TNF) generation, JNK activation, mitochondrial permeability transition (MPT), and reactive oxygen species overproduction.<sup>5-8</sup>

Sphingolipids, ceramide in particular, have emerged as signaling lipid intermediates that play a role in the stress response, and as mediators of apoptosis and autophagic cell death (type II programmed cell death).<sup>9-12</sup> Ceramide levels in cells can increase by *de novo* synthesis in the endoplasmic reticulum from the N-acylation and subsequent desaturation of sphinganine.<sup>13</sup> However, early ceramide increases are often associated with sphingomyelinase (SMase) activation, which hydrolyzes sphingomyelin to yield ceramide.<sup>11</sup> This pathway contributes to the rapid upregulation of ceramide and may promote specific microdomain formation in the plasma membrane,

*Abbreviations:* I/R, ischemia-reperfusion; NF-κB, nuclear factor-κB; TNF, tumor necrosis factor-α; MPT, mitochondrial permeability transition; NSMase, neutral sphingomyelinase; ASMase, acidic sphingomyelinase; GCS, glucosylceramide synthase; SMS, sphingomyelin synthase; ACDase, acid ceramidase; PTX, pentoxifylline; NOE, N-oleylethanolamine; NCDase, neutral ceramidase; ALT, alanine aminotransferase; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick-end labeling; PCR, polymerase chain reaction; IL-12, interleukin-12; d-threo-PDMP, d-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-propanol HCl.

From the Liver Unit, Hospital Clínic, Instituto Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS); and the Department of Experimental Pathology, Instituto Investigaciones Biomédicas Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Spain.

Received January 26, 2006; accepted May 30, 2006.

Supported in part by the Research Center for Liver and Pancreatic Diseases, P50 AA 11999; US National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 1R21 AA014135-01; Plan Nacional de I+D, SAF 02-3564 and 03-04974; Red Temática de Investigación Cooperativa, G03/015; Red de Centros, C03/02; and Instituto de Salud Carlos III, FIS 04/1039, 03/0426, 02/3057 and 02/0339.

J. C. Fernandez-Checa and A. Morales share senior authorship.

Laura Llacuna and Montserrat Mari have contributed equally to the work.

Address reprint requests to: J. C. Fernandez-Checa or Albert Morales, Liver Unit, Hospital Clínic i Provincial c/Villarreal, 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: [checa229@yahoo.com](mailto:checa229@yahoo.com); fax: (34) 93-451-5272.

Copyright © 2006 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

Published online in Wiley InterScience ([www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)).

DOI 10.1002/hep.21285

Potential conflict of interest: Nothing to report.

allowing oligomerization of certain cell surface proteins such as ligand receptors (TNF family).<sup>14</sup> Several SMases have been characterized, of which the neutral SMase (NSMase), with an optimum pH at 7.5, Mg<sup>2+</sup> dependent and membrane bound, and the acidic SMase (ASMase), with an optimum pH at 4.8, are of relevance in the signaling of diverse cell death stimuli.<sup>11,15-18</sup>

Ceramide levels are tightly regulated in cells, and hence, its potential participation in death signaling can be modulated by metabolic pathways that transform ceramide in other derivatives. For instance, ceramide can be metabolized into complex glycosphingolipids by its glucosylation in the cytosolic surface of the Golgi catalyzed by the rate-limiting enzyme glucosylceramide synthase (GCS).<sup>19</sup> In addition, ceramide can be transformed into sphingomyelin<sup>20</sup> by sphingomyelin synthase (SMS) or deacylated by ceramidases (CDases) into sphingosine.<sup>17,21</sup> The phosphorylation of sphingosine by sphingosine kinase generates sphingosine-1-phosphate, a bioactive lipid with anti-apoptotic properties.<sup>17,18,22</sup>

Previous studies using mice deficient in *TNF* gene or *TNF receptor 1* (TNFR1) have identified TNF as a critical mediator in warm hepatic I/R injury.<sup>5,6,23</sup> Moreover, increased hepatic ceramide levels have been observed in cold ischemia and warm reperfusion,<sup>24</sup> although its consequences and regulation were not further examined. Furthermore, the regulation of SMases has been reported in a rat model of I/R, with NSMase being stimulated during the reperfusion of the ischemic liver, as opposed to ASMase, whose activity decreased.<sup>25</sup> However, their impact on ceramide regulation and contribution to hepatic I/R injury were not addressed. Because ceramide overgeneration by ASMase has been shown to contribute to TNF-induced hepatocellular cell death and liver injury,<sup>16,26</sup> the aims of this study were first to examine whether ASMase contributes to warm hepatic I/R injury, because this specific aim has not been previously reported, and second, to analyze the metabolic regulation of ceramide during I/R. We describe here a critical role for ceramide generation through ASMase activation in hepatic I/R injury, which may be of therapeutic relevance because its pharmacological inhibition or suppression by siRNA protects the liver from I/R-induced damage.

## Materials and Methods

**Reagents, Antibodies, and Cells.** See Supplementary Materials and Methods (Available at: <http://interscience.wiley.com/jpages/0270-9139/suppmat/index.html>.)

**Partial and Total Hepatic Ischemia and Treatments.** Animal studies were approved by the IDIBAPS Animal Care and Use Committee. ASMase knockout

mice (C57BL/6 strain) were propagated using heterozygous breeding pairs and genotyped as described previously.<sup>16,26</sup> Hepatic partial warm ischemia was performed during 90 minutes in wild-type or ASMase<sup>-/-</sup> (8-12 weeks) mice as described previously.<sup>6</sup> Animal survival was determined using a model of total hepatic ischemia in male wild-type mice (25-30 g), in which only the ischemic tissue is left in place.<sup>7</sup> Control animals were sham operated. See Supplementary Materials and Methods for detailed protocols and treatments.

**Enzyme Activities, Ceramide, Ganglioside, and TNF Determinations.** Mg<sup>2+</sup>-dependent NSMase and ASMase activities were determined from [N-methyl-<sup>14</sup>C]sphingomyelin (56.6 mCi/mmol, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) as described.<sup>27</sup> CDase activities were measured using 5  $\mu$ mol/L [<sup>14</sup>C]ceramide (55 mCi/mmol, ARC, St. Louis, MO) or C<sub>12</sub>-NBD ceramide (Molecular Probes, Eugene, OR) in 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 for the neutral/alkaline CDase or 0.5 mol/L acetate buffer, pH 4.5, for the acid CDase.<sup>21,28</sup> The GCS and SMS were determined as described previously.<sup>29</sup> Cellular lipids were extracted, dried under N<sub>2</sub>, and subjected to mild alkaline hydrolysis (1N methanolic KOH, 1 hour, 37°C) to remove glycerol phospholipids. Ceramide levels were quantified from liver samples by the DG kinase assay.<sup>10</sup> Sphingolipids were separated in LK6D gel 60A TLC plates using chloroform/acetic acid (90:10). Labeled spots were scraped and quantified using a scintillation counter or a Fuji BAS-2500 PhosphoImager system. Hepatic ganglioside levels during I/R were determined by high-performance thin-layer chromatography as described previously.<sup>16</sup> Total TNF (bound and free) levels in serum and hepatic tissue were measured using a mouse-specific competitive enzyme immunoassay kit (Chemicon, Temecula, CA).

**Liver Histology and Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Nick-End Labeling.** See Supplementary Materials and Methods.

**Western Blotting and Caspase Activation.** The release of mitochondrial proteins was monitored using cytochrome c (1:2000) and Smac/DIABLO (1:2000) antibodies<sup>30</sup> and quantitated by scanning densitometry. JNK and AKT phosphorylation were analyzed in cell extracts using phospho-JNK (1:2500) and phospho-AKT (1:2000) antibodies. Mitochondrial fractions, obtained as previously indicated,<sup>10</sup> were used to analyze Bim and phospho-Bim (1:1000) levels. Caspase-3 activation was monitored by immunohistochemistry with an active caspase-3 antibody (clone C92-605), whereas its activity was quantified as described.<sup>30</sup>

**Real-time Polymerase Chain Reaction.** See Supplementary Materials and Methods.

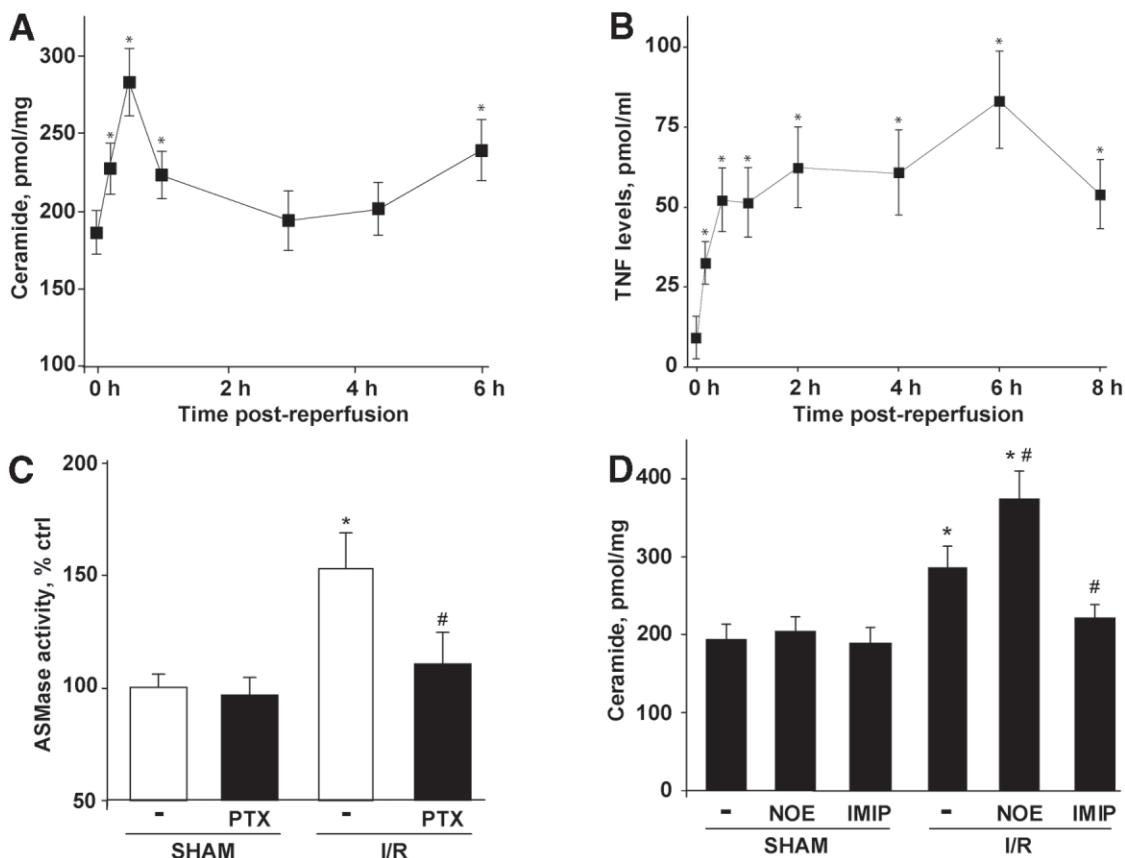


Fig. 1. Ceramide regulation during I/R. (A) Mice were subjected to I/R and the hepatic content of ceramide was determined at different times post-reperfusion as indicated. The levels of ceramide in control (sham) mice were  $171 \pm 18$  pmol/mg protein ( $n = 3$ ).  $*P \leq .043$  versus control. (B) TNF levels were determined in serum at different times post-reperfusion ( $n = 3$ ).  $*P \leq 0.012$  versus sham control. (C) ASMase activity was determined in liver extracts 15 minutes post-reperfusion from vehicle- or pentoxifylline (PTX)-pretreated mice. Control mice were sham operated. ( $n = 3$ ).  $*P = .017$  versus control.  $\#P = .033$  versus untreated I/R. (D) Ceramide levels were quantified in liver 30 minutes post-reperfusion. In some cases, mice were pretreated with ASMase inhibitor (imipramine, 25 mg/kg), ACDase inhibitor (NOE, 100 mg/kg) or vehicle (saline) 30 minutes before surgery. Control mice were sham operated. ( $n = 3$ ).  $*P \leq .011$  versus control.  $\#P \leq .045$  versus untreated I/R.

**In Vitro siRNA Transfection and In Vivo Treatment.** siRNA transfection into the murine hepatoma cell line H1c1c7 was accomplished with siPORTamine<sup>TM</sup> cationic solution (Ambion, Austin, TX). siRNA-mediated silencing of ASMase was verified at the enzyme level by measuring ASMase activity and at mRNA level by real-time polymerase chain reaction (PCR) as described in the supplementary Methods. For *in vivo* experiments, chemically synthesized siRNAs (Curevac, Tübingen, Germany) were delivered into mice using the hydrodynamic transfection method<sup>31,32</sup> by intravenously injecting 1 nmol scrambled or ASMase siRNAs in 1 mL phosphate-buffered saline into the tail vein 24 and 48 hours before surgery. For additional information, see Supplementary Materials and Methods.

**Statistical Analyses.** Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation with the number of individual experiments detailed in figure legends. Statistical significance of the mean values was established by the

Student's *t* test. Animal survival was evaluated using the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test.

## Results

**Transient Accumulation of Ceramide by Sequential Activation of ASMase and Acid Ceramidase During I/R.** The levels of ceramide increased transiently during reperfusion compared with sham controls, with two peaks at 30 minutes and 6 hours post-reperfusion (Fig. 1A), returning to basal levels after 6 hours (not shown). Because ceramide levels reflect the balance between its generation and metabolism, we next analyzed the activity of the enzymes involved in ceramide regulation. As seen, only the activities of ASMase and acid ceramidase (ACDase) were stimulated during the reperfusion phase, without changes in NSMase, GCS or NCDase (Fig. 2A-E). The SMS activity, however, de-

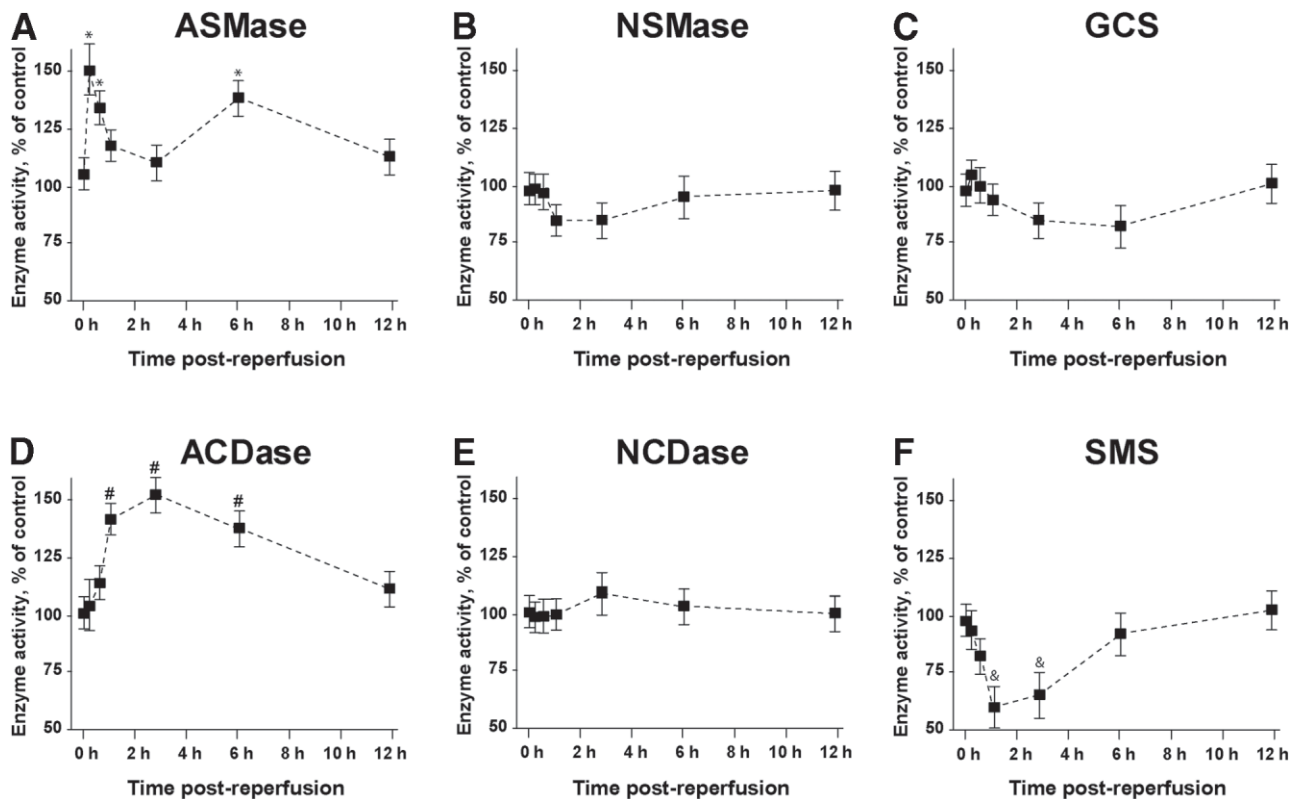


Fig. 2. Activation of ASMase and ACDase during I/R. Liver samples were taken at different times after I/R and homogenized to measure the enzymatic activity of ASMase (A), NSMase (B), GCS (C), ACDase (D), NCDase (E), and SMS (F) ( $n = 3-4$ ). \* $P \leq .009$  versus control. # $P \leq .006$  versus control. & $P \leq .010$  versus control.

creased between 1 and 3 hours after reperfusion (Fig. 2F). ASMase exhibited two peaks of activity, an early one by 10 to 30 minutes and a later peak by 6 hours after reperfusion (Fig. 2A). ACDase, however, displayed an activation window between 1 and 6 hours post-reperfusion (Fig. 2D). Because TNF activates ASMase,<sup>11,16</sup> we next determined the kinetics of serum TNF release during I/R (Fig. 1B). In agreement with previous findings,<sup>5</sup> we observed an early increase by 10 to 15 minutes post-reperfusion that lasted for up to 8 hours (Fig. 1B). Similarly, TNF levels were enhanced in liver samples post-reperfusion (not shown). Moreover, pentoxifylline (PTX), a well-established inhibitor of TNF production *in vivo*, which prevented I/R-induced hepatic damage,<sup>6</sup> suppressed the ASMase activation during I/R (Fig. 1C) and the subsequent increase in ceramide levels (not shown), indicating that TNF release during I/R mediates the activation of ASMase.

**Pharmacological Regulation of Ceramide Modulates Hepatic I/R Injury.** To establish the relationship between ASMase/ACDase activation and hepatic ceramide accumulation, we tested the effect of inhibition of both enzymes in ceramide homeostasis during I/R. Imipramine, which prevents ASMase activation,<sup>16,33</sup> and N-

oleoylethanolamine (NOE), a potent ACDase inhibitor,<sup>21,34</sup> were administered 30 minutes before surgery. Imipramine, which prevented the I/R-induced ASMase activation, decreased the peak of ceramide levels generated 30 minutes after reperfusion (Fig. 1D). As expected, NOE enhanced the accumulation of ceramide with respect to the group subjected to I/R (Fig. 1D). Neither imipramine nor NOE modulated hepatic ceramide levels of sham-operated mice. Furthermore, we examined the impact of ceramide regulation on hepatic I/R injury. As indicated, I/R caused hepatic injury reflected by serum alanine aminotransferase (ALT) levels and liver histology (Fig. 3A-B). In addition, we observed significant terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick-end labeling (TUNEL)-positive hepatocytes after I/R (Fig. 3C), consistent with the coexistence of oncotic necrosis and apoptotic cell death.<sup>7,8</sup> Importantly, imipramine pretreatment protected the liver against I/R injury, as seen by ALT levels, histology, and TUNEL staining, whereas NOE enhanced the extent of hepatic injury (Fig. 3A-C). Imipramine pretreatment, however, did not affect the phosphorylation of Akt or the level of nuclear p65 measured in hepatic extracts after I/R (Fig. 3D), indicating that the protective effect of imipramine is unrelated to NF- $\kappa$ B signaling.



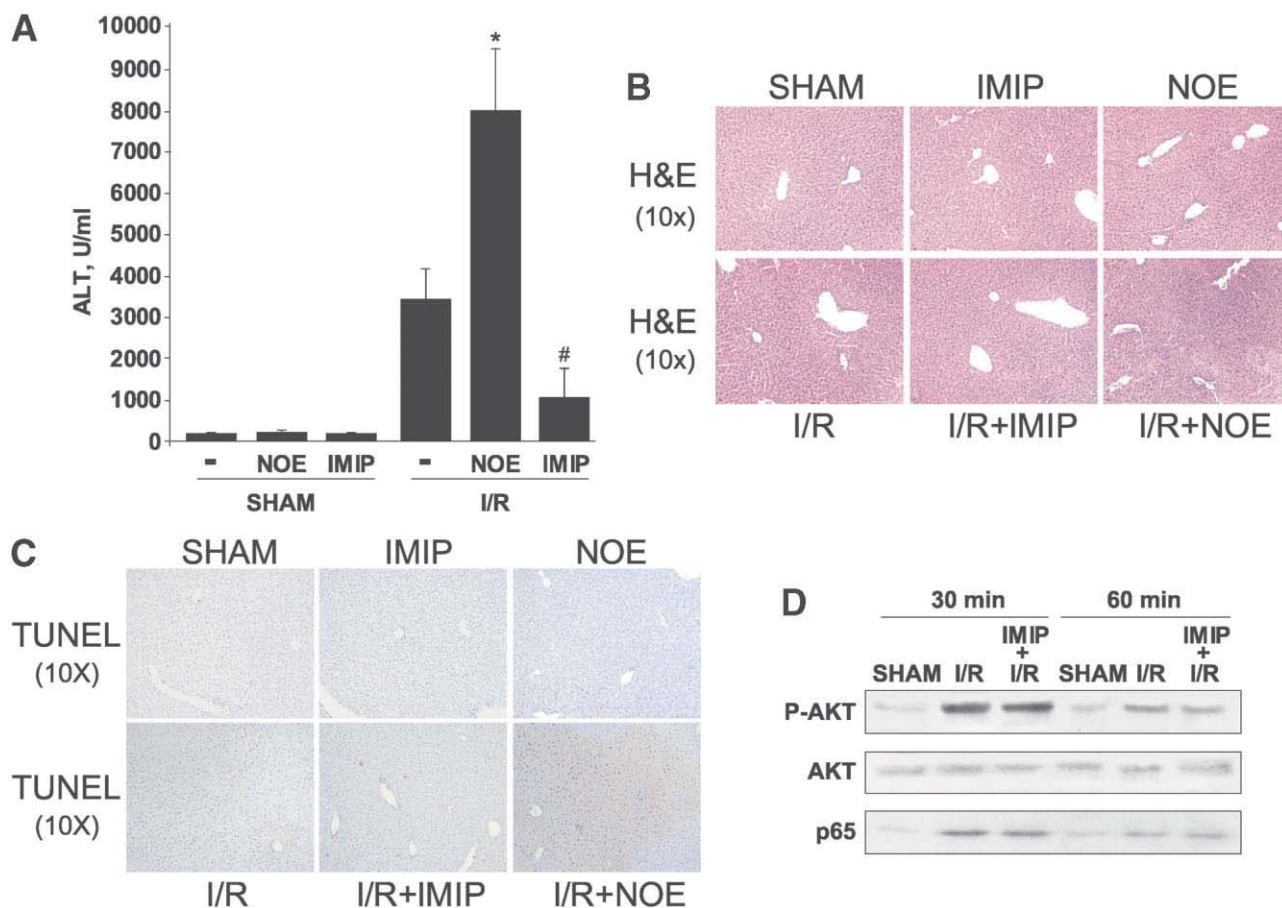


Fig. 3. Modulation of hepatic I/R damage by ceramide generation. (A) Serum ALT levels were measured 6 hours post-reperfusion from sham-operated or I/R-exposed mice pretreated with imipramine (IMIP), NOE, or vehicle ( $n = 4$ ).  $*P = .022$  and  $\#P = .031$  versus untreated mice subjected to I/R. (B-C) Representative HE and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick-end labeling (TUNEL) images of liver sections 6 hours post-reperfusion (magnification 10 $\times$ ) from mice treated as above. (D) A representative Western blot from four independent experiments showing AKT phosphorylation in cell fractions and p65 levels in nuclear extracts, after 30 and 60 minutes post-reperfusion.

**ASMase Down-Regulation by siRNA Protects the Liver Against I/R-Induced Damage.** To further verify the role of ASMase-induced ceramide generation in hepatic I/R damage and discard potential side effects of imipramine, we used two approaches. First we performed hepatic I/R in ASMase<sup>-/-</sup> mice. However, most (80%-90%) ASMase<sup>-/-</sup> mice died shortly after anesthesia during ischemia (not shown), because of severe pulmonary dysfunction as characterized previously.<sup>35</sup> Therefore, we used an alternate loss-of-function approach using RNA interference, which has been used successfully in silencing gene expression in the liver.<sup>31,32</sup> siRNA efficacy to deplete ASMase mRNA levels was verified in Hepa1c1c7 cells by real time PCR (Fig. 4A), and was accompanied by the reduction of the endogenous ASMase activity (Fig. 4B), whereas the scrambled siRNA did not display any effect. In addition, ASMase-siRNA did not affect the endogenous activities of NSMase or GCS (Fig. 4B), or those of ACDase, NCDase, or SMS (not shown), leading us to examine its effects *in vivo*.

Double-stranded RNA duplexes may elicit immune responses via interactions with Toll-like receptors 3 and 9,<sup>36</sup> and hence we investigated this possibility by examining the involvement of immune responses in the potential effects of ASMase-siRNA on hepatic I/R *in vivo*. Interleukin-12 (IL-12) levels were measured in mice 2 hours after injection of ASMase-siRNA, scrambled siRNA, or saline with respect to mice treated with Poly I:C, an analog of dsRNA that is recognized by TLR3 and elicits immune responses in mice.<sup>36</sup> As seen, in contrast to the effect observed after Poly I:C injection, no significant increase in IL-12 serum levels were detected in mice treated with ASMase-siRNA (Fig. 4C), consistent with recent reports using naked siRNAs.<sup>37</sup> Next, mice were injected into the tail 2 consecutive days with either ASMase-siRNA or scrambled siRNA and then subjected to I/R the day after the last dose. ASMase-siRNA decreased hepatic ASMase mRNA levels (Fig. 4D) and inhibited ASMase activity translating in a reduction in the levels of ceramide after reperfusion (Fig. 4E). Importantly, AS-

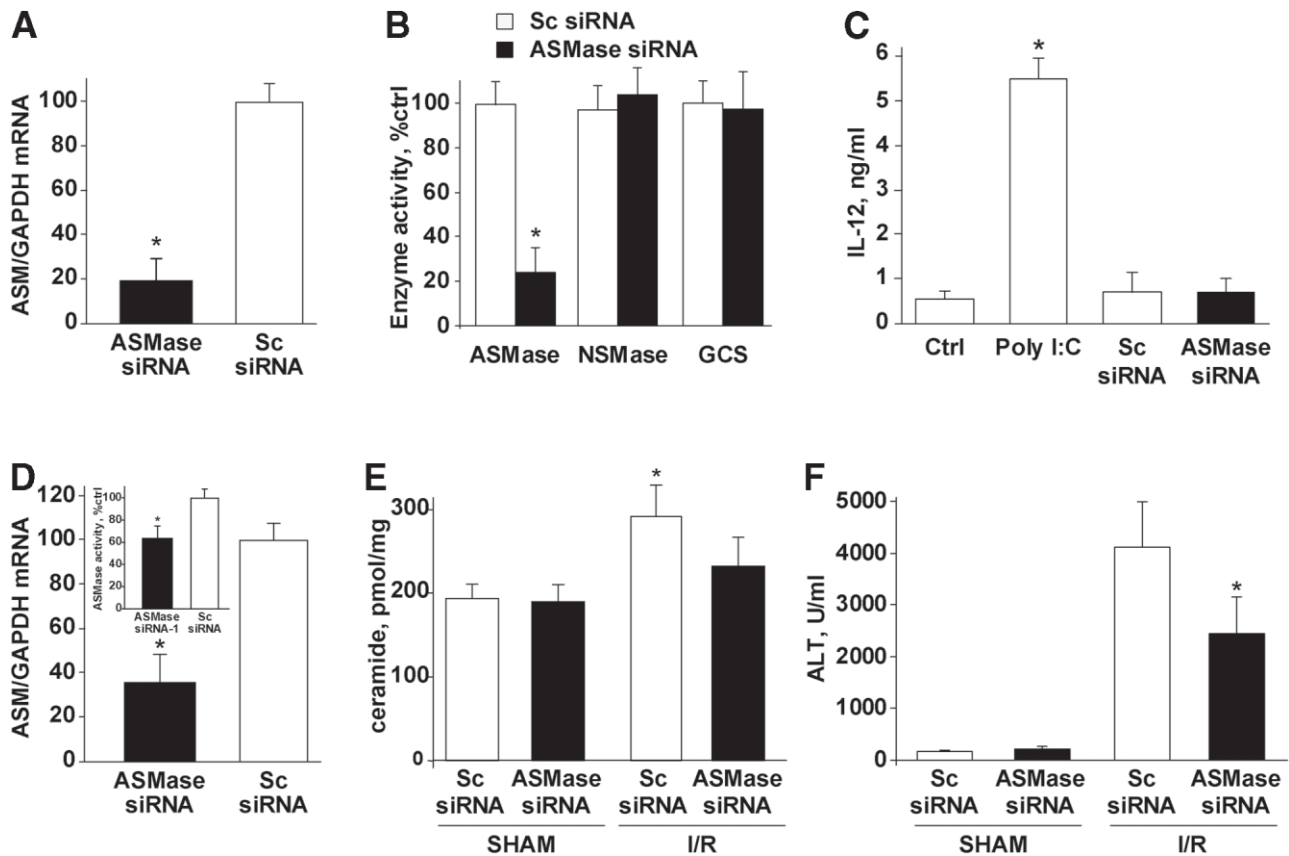


Fig. 4. Suppression of ASMase activity by siRNA reduces I/R-induced liver injury. Murine hepatoma H1c1c7 cells were transfected with ASMase-siRNAs (closed bars) or a scrambled control siRNA (Sc siRNA, open bars). (A) ASMase mRNA levels were measured after 36 hours ( $n = 4$ ).  $*P = .001$  versus Sc siRNA-transfected cells. (B) ASMase, NSMase, and GCS activities were assayed in cell extracts ( $n = 4$ ).  $*P = .001$  versus Sc siRNA-transfected cells. (C) IL-12 serum levels of mice injected with saline, Poly I:C, scrambled siRNA or ASMase-siRNA 24 hours before surgery ( $n = 3$ ).  $*P = .005$  versus saline-injected animals. (D) Specific suppression of ASMase mRNA *in vivo* measured by real-time PCR after two intravenous injections with ASMase-siRNA or scrambled siRNA 24 hours before surgery. Results are expressed as percentage of change of the ASMase/GAPDH mRNA ratio in sham-operated animals. ( $n = 4$ ).  $*P \leq .012$  versus Sc siRNA-injected animals. Inset shows activity in the same group of mice. (E) Ceramide levels 30 minutes post-reperfusion from liver samples of mice treated with ASMase-siRNA or scrambled siRNA 24 hours before surgery ( $n = 3$ ).  $*P = .045$  versus Sc siRNA-injected animals. (F) Serum ALT levels 6 hours post-reperfusion from mice treated with ASMase siRNA or scrambled siRNA 24 hours before surgery ( $n = 4$ ).  $*P = .042$  versus Sc siRNA-injected I/R-exposed animals.

Mase-siRNA reduced the extent of I/R-induced hepatic damage monitored by serum ALT levels (Fig. 4F), histology, or TUNEL (not shown). These data establish a key role of ASMase in hepatic I/R injury.

**Ceramide Regulation During I/R Modulates the Mitochondrial Cell Death Pathway.** Because ceramide is known to play a role in cell death pathways through mitochondria,<sup>10,11</sup> we next examined the mitochondrial release of cytochrome c and Smac/DIABLO during I/R. As seen, I/R caused the release of cytochrome c and Smac/DIABLO after I/R (Fig. 5A). This outcome was accompanied by active caspase 3 detected by fluorescence assay or immunohistochemistry (Fig. 5B-C). Of note, the number of positive cells observed were less than those stained with TUNEL (Fig. 3C). Next, we examined whether the regulatory role of ceramide on hepatic I/R damage was accompanied by appropriate changes in the

apoptosome assembly. Although imipramine treatment reduced cytochrome c and Smac/DIABLO release from mitochondria by I/R, NOE enhanced the release of these apoptogenic proteins from mitochondria (Fig. 5A). In addition, caspase 3 activation induced by I/R was reduced or enhanced by imipramine or NOE pretreatment, respectively (Fig. 5B-C).

**JNK Activation by I/R Is Suppressed by ASMase Inhibition.** To identify the potential downstream intermediates of ASMase-mediated hepatic I/R injury, we focus on complex glycosphingolipids and gangliosides because in cultured hepatocytes ganglioside GD3 mediates TNF-induced death.<sup>16</sup> Gangliosides are synthesized from ceramide on its glucosylation by GCS, which is inhibited by *d-threo*-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-propanol HCl (PDMP).<sup>16,19</sup> Unexpectedly,

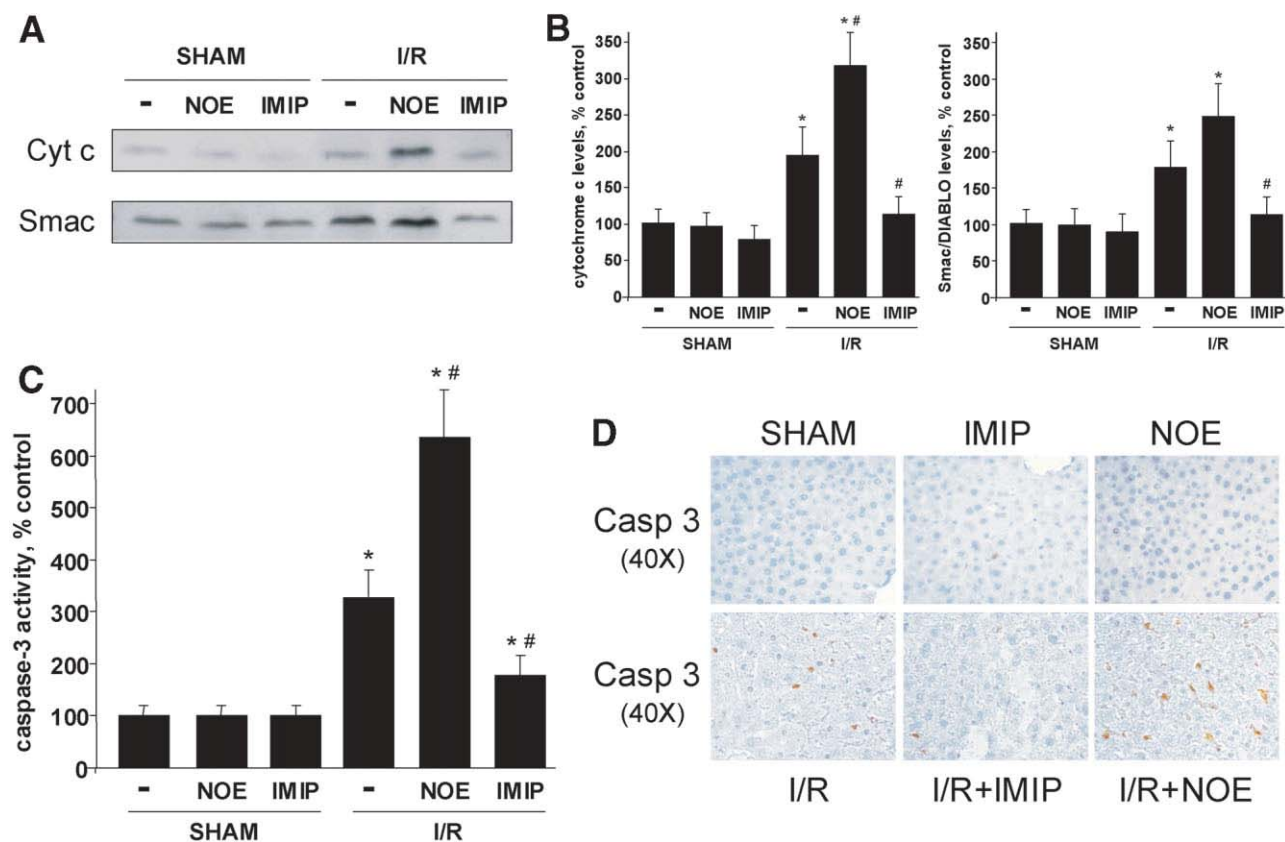


Fig. 5. Ceramide modulates mitochondrial cytochrome c release and caspase 3 activation during I/R. (A) Representative Western blot showing the presence of cytochrome c and Smac/DIABLO in cytosol 4 hours post-reperfusion with imipramine (IMIP), NOE, or vehicle treatment before surgery. Results are from three independent experiments expressed as percentages with respect to sham-operated animals.  $*P \leq .031$  versus sham-operated control animals.  $\#P \leq .048$  versus untreated mice subjected to I/R. (B) Caspase 3 activity in liver extracts 6 hours post-reperfusion from mice pretreated with imipramine (IMIP), NOE, or vehicle was measured fluorometrically (ex 380 nm, em 460 nm) ( $n = 4$ ).  $*P \leq .035$  versus sham-operated animals.  $\#P \leq .048$  versus vehicle-treated mice subjected to I/R. (C) Representative immunohistochemical staining of active caspase 3 fragment in liver sections 6 hours after reperfusion (magnification 40 $\times$ ) from mice treated with imipramine (IMIP), NOE, or vehicle before surgery.

pretreatment with PDMP 30 minutes before surgery did not protect the liver against I/R injury (Fig. 6A), consistent with the lack of GCS activation during I/R (Fig. 2C). Moreover, no changes in the pattern of gangliosides were observed during I/R (not shown), thus further discarding a role for gangliosides in the hepatic I/R injury.

JNK inhibition has been reported to protect the liver against I/R-induced apoptotic/necrotic cell death,<sup>7</sup> and the apoptotic role of ceramide is exerted through JNK activation.<sup>38-40</sup> Therefore, we evaluated whether the role of ceramide in hepatic I/R damage is mediated by JNK activation. I/R resulted in the phosphorylation of JNK (p46 and p54 isoforms, Fig. 6B), and this was accompanied by phosphorylation of c-Jun (not shown). JNK activation contributed to the hepatic damage induced by I/R since SP600125, a potent and specific JNK inhibitor,<sup>41</sup> protected against I/R-induced hepatic damage as reflected by serum ALT levels (Fig. 6C) or histology (not shown). Importantly, imipramine pretreatment, which decreased ceramide generation and protected the liver against I/R

(Figs. 1D and 3A), prevented JNK phosphorylation caused by I/R (Fig. 6B). SP600125, however, did not prevent the early increase in ceramide levels during the reperfusion phase, or ASMase activation (not shown), indicating that JNK activation is downstream of ASMase stimulation during I/R. In addition, because ceramide-induced phosphorylation and translocation of Bim to mitochondria are mediated by JNK,<sup>40</sup> we analyzed its phosphorylation during I/R. As seen, Bim<sub>L</sub> and its phosphorylated form both translocated to the mitochondria and, more importantly, imipramine and SP600125 suppressed these events (Fig. 6D).

**Ceramide Regulation Modulates Survival After Total Hepatic I/R.** We next examined the survival rate in a model of total hepatic I/R in which survival depends on recovery of the ischemic liver after reperfusion. Mice ( $n = 8-12$  per group) were subjected to 60 minutes of ischemia instead of the 90-minute period used in the partial ischemic experiments because this protocol killed all mice within 24 hours of total hepatic I/R. Under these condi-

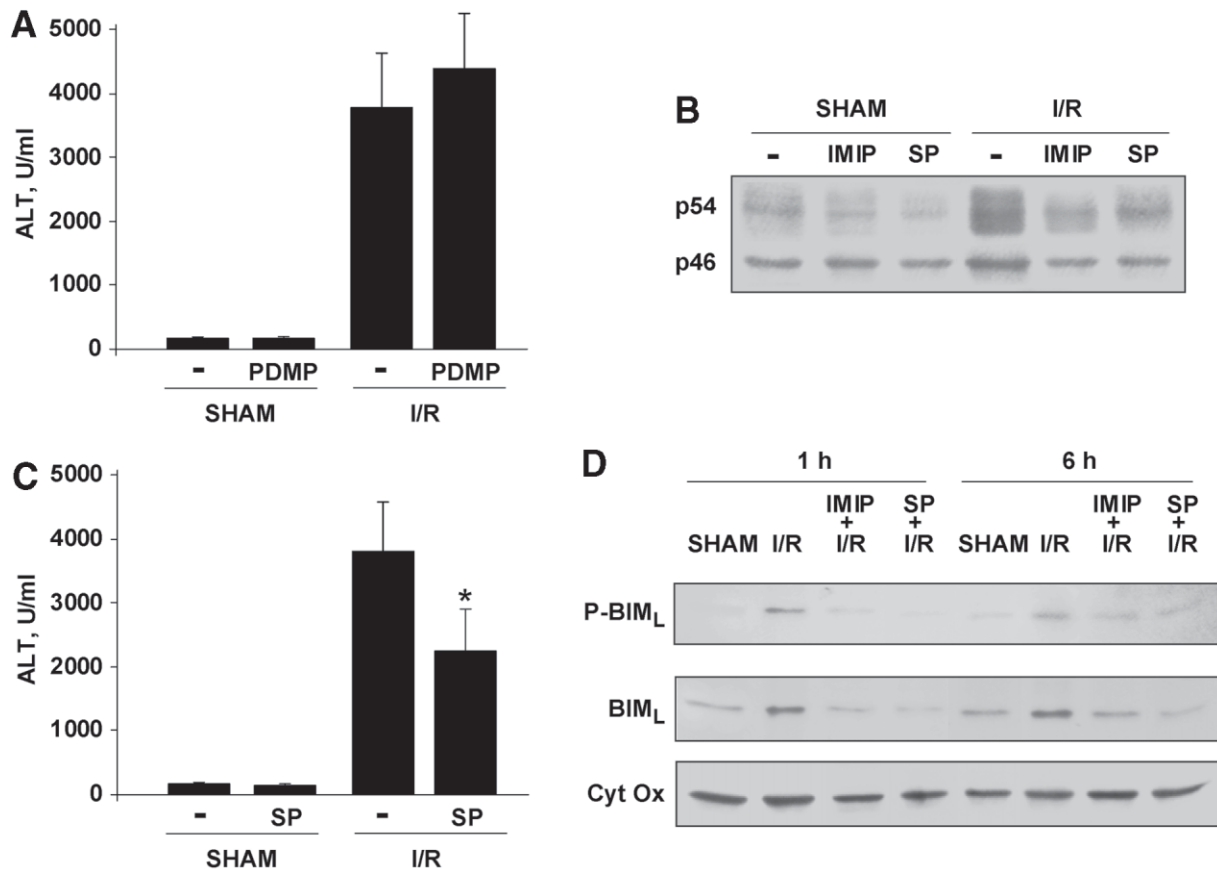


Fig. 6. Inhibition of JNK activation by ASMase-induced ceramide but not GCS protects against hepatic I/R injury. (A) Serum ALT levels 6 hours post-reperfusion from mice pretreated with PDMP (75 mg/kg) or vehicle (5% Tween 20 in saline) before surgery ( $n = 4$ ). (B) Representative Western blot of JNK phosphorylation in liver extracts 30 minutes post-reperfusion. In some cases, mice were pretreated with SP600125 (SP) or imipramine (IMIP) 30 minutes before ischemia. (C) Serum ALT levels 6 hours post-reperfusion from mice pretreated with JNK inhibitor (SP600125, 20 mg/kg) or vehicle (1% dimethylsulfoxide in saline) before surgery ( $n = 5$ ). \* $P = .024$  versus untreated I/R-injured animals. (D) 1 and 6 hours after I/R liver samples from mice pretreated with vehicle, IMIP or SP600125 were processed for mitochondria isolation to examine the levels of Bim, phospho-Bim, and cytochrome c oxidase by Western blot. Representative blot of three to four independent experiments is shown.

tions, 8 of 12 vehicle-treated mice subjected to total ischemia died within the first 72 hours post-reperfusion (Fig. 7A), with histological evaluation on autopsies showing massive necrosis in the liver (not shown), consistent with previous reports.<sup>7,8</sup> However, imipramine pretreatment markedly improved the survival rate with 9 of 11 treated mice surviving after 7 days post-reperfusion (Fig. 7A). In contrast, all NOE-treated mice (8 of 8) died within 48 hours postischemia, with 75% of animals dying within 24 hours of reperfusion (Fig. 7A). Thus, these data demonstrate the relevance of the pharmacological regulation of ceramide in hepatic I/R injury.

## Discussion

This study examines the role of ASMase in the homeostasis of ceramide and its contribution to hepatic I/R injury. Here we describe the transient generation of ceramide during I/R due to the sequential activation of ASMase followed by ACDase stimulation. Because ASMase

generates ceramide from sphingomyelin hydrolysis whereas ACDase catabolyzes it, the time-dependent pattern in the activation of these ceramide-regulating enzymes accounts for the temporal window in which ceramide peaked during I/R. These observations raise several questions, namely, how these enzymes become stimulated in the liver during I/R and what would be the consequences of their activation for hepatic function in I/R?

**TNF Release During I/R Activates ASMase.** TNF upregulation by activated Kupffer cells plays a key role in hepatic I/R injury,<sup>5,6,23</sup> and TNF-induced hepatocellular death is mediated in part through ASMase activation.<sup>11,16</sup> During I/R we detected an early release of TNF and postulated that this cytokine may contribute to I/R-induced ASMase activation. PTX, a methylxanthine inhibitor of TNF production *in vivo*,<sup>6,42</sup> prevented the activation of ASMase and the consequent increase in ceramide levels observed during I/R. The mechanism for ACDase stimu-

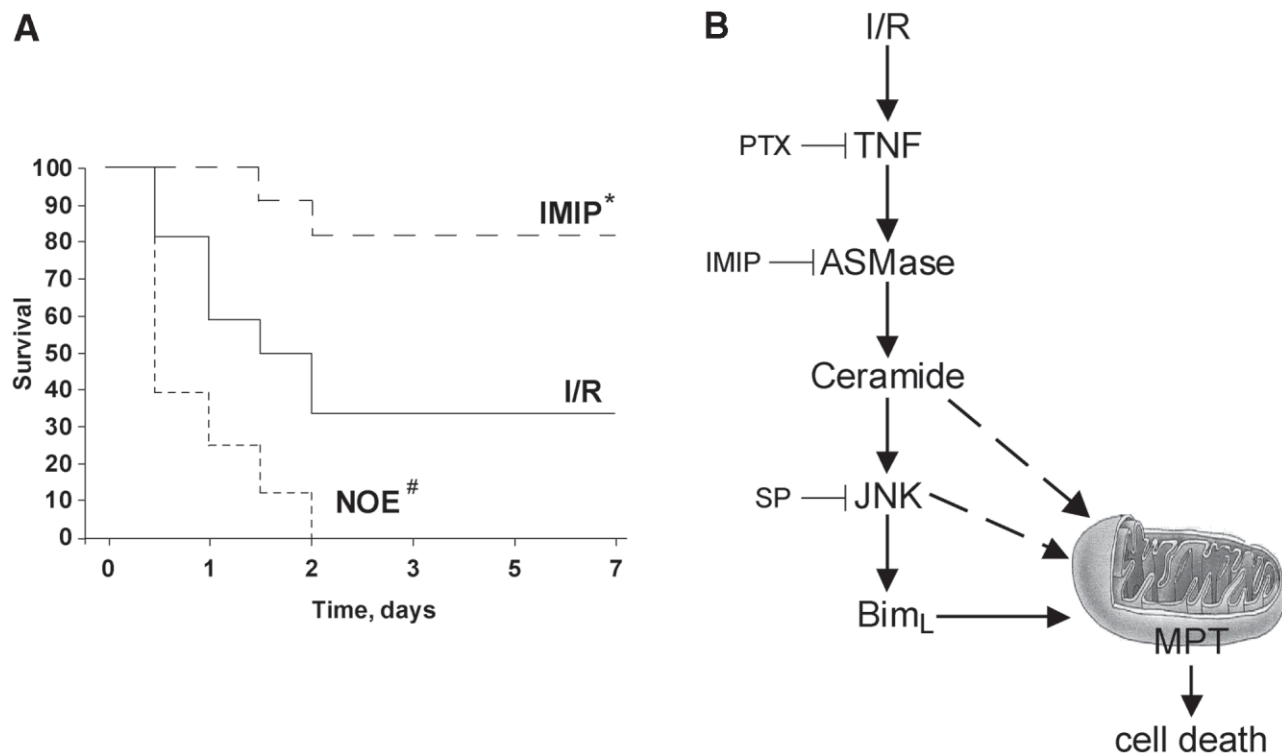


Fig. 7. Ceramide regulation modulates survival after total hepatic ischemia. (A) Mice pretreated with vehicle (saline), imipramine (IMIP) (25 mg/kg), or NOE (100 mg/kg) before surgery were subjected to total liver ischemia for 60 minutes. Animals were monitored twice per day during 7 days. \* $P = .035$  and # $P = .013$  versus saline-treated I/R mice by log rank test,  $n = 8-12$  in each group. (B) Schematic diagram summarizing the findings. The generation of ceramide during I/R targets mitochondria through JNK activation and subsequent translocation of Bim<sub>L</sub> to mitochondria, culminating in hepatocellular death. PTX or IMIP, which prevented ASMase activation, abolished JNK activation, and attenuated mitochondrial-dependent hepatocellular death. The dashed line denotes that although ceramide generated from ASMase activation may directly target mitochondria, this possibility remains to be tested.

lation by I/R is currently unknown. However, it has been reported that the overexpression of ACDase in human skin fibroblasts led to ASMase stimulation and that ASMase could be co-precipitated with ACDase using anti-ceramidase antibodies,<sup>43</sup> suggesting the physical interaction between these acid pH optimum enzymes. Whether this outcome occurs in I/R remains to be established. Moreover, we did not address the role of the ACDase activation during I/R in modulating hepatic injury, although it can be expected that through ceramide deacylation, ACDase would generate sphingosine, which may be further metabolized to sphingosine 1-phosphate, a bioactive lipid with anti-apoptotic properties.<sup>17,18,22</sup> In line with this, it has been shown that ACDase overexpression prevented TNF-induced death in L929 cells,<sup>21</sup> whereas NCDase transfection protected rat hepatocytes from TNF-induced cell death through ASMase activation.<sup>44</sup>

**Ceramide Generation Through ASMase Contributes to Hepatocellular Death.** The next question we addressed was whether ceramide signals hepatocellular death and whether hepatic I/R injury would be modulated by the generation of ceramide. Tissue damage dur-

ing I/R can proceed through adenosine triphosphate-dependent necrosis or caspase-dependent apoptosis, two forms of cell death that are regulated by MPT.<sup>8,45</sup> The release of cytochrome c from mitochondria is a key event in caspase 3 activation through the apoptosome assembly. Although the release of cytochrome c in I/R we observed may seem modest, it closely correlated with the degree of caspase 3 activation. Even in the case of NOE pre-treatment in which the degree of liver injury estimated by ALT release and histology is rather substantial compared with vehicle-treated mice, the level of cytochrome c released into the cytosol is enhanced from twofold to approximately 3.5-fold. Although this increment is reflected in the activation of caspase 3, it suggests that the release of cytochrome c from mitochondria is highly regulated. Cytochrome c is anchored to the mitochondrial membrane through both electrostatic and hydrophobic interactions with acidic phospholipids, most notably cardiolipin, and recent observations indicated that the releasable pool of cytochrome c is determined by its interaction with cardiolipin, which undergoes a cytochrome c-mediated peroxidation.<sup>46</sup> Whether cytochrome c release correlates with

the loss of cardiolipin in hepatic I/R injury remains to be established. Accordingly, the contribution of apoptosis to hepatic I/R injury appears to be relatively minor as it normally occurs in isolated hepatocytes. In contrast, necrosis affects extensive areas of parenchymal cells consistent with the massive release of ALT in serum that reflects plasma membrane leakage, indicating that necrosis is the predominant form of liver injury during I/R.<sup>8</sup> In line with this, recent studies in cyclophilin D null mice revealed a critical role of MPT in necrotic cell death in heart, liver, and brain.<sup>45</sup>

To examine the impact of ceramide in hepatic I/R injury, we inhibited ASMase and ACDase before surgery. Imipramine, a tricyclic antidepressant that inhibits the activity of ASMase due to the hydrolysis of the active ASMase form,<sup>16,33</sup> prevented the generation of ceramide post-reperfusion and decreased hepatocellular death. Although, unfortunately, the use of ASMase<sup>-/-</sup> mice was precluded because of pulmonary dysfunction and sensitivity to ischemia due to accumulation of sphingomyelin in their lungs,<sup>35</sup> the suppression of ASMase *in vivo* by siRNA reduced the activation of ASMase, diminished ceramide generation, and protected the liver from I/R-induced damage, thus verifying the results observed with imipramine. Moreover, PTX, which has been reported to protect the liver against I/R injury,<sup>6</sup> prevented the activation of ASMase and the consequent ceramide generation by I/R (Fig. 1C). In contrast, the inhibition of ACDase resulted in enhanced ceramide content and potentiation of the I/R-induced hepatic damage. Of potential clinical significance is the fact that *in vivo* pretreatment with imipramine extended the survival of mice subjected to total liver ischemia.

**Mitochondrial Targeting by ASMase-Induced Ceramide.** Earlier studies in isolated mitochondria indicated that ceramide induced MPT and reactive oxygen species,<sup>10,16</sup> thus implying that the ceramide generation during I/R elicits MPT, with the phenotype of hepatocyte demise modulated by the extent of adenosine triphosphate depletion. The question that arises then is how ceramide targets mitochondria and regulates hepatocyte cell death during I/R. We discard the involvement of glucosylceramide and glycosphingolipids (such as GD3) generation in hepatic I/R injury. Consistent with these observations, I/R did not stimulate GCS, nor increased glucosylceramide or GD3 levels, and PDMP, a GCS inhibitor, failed to protect against I/R. These unexpected findings indicate that although the TNF-ASMase arm occurs in both isolated hepatocytes and hepatic I/R, the ASMase-GCS connection does not seem to occur in the latter. Whether this relates to differences in TNF dosage, signaling, or other factors requires further investigation.

We considered the possibility that ceramide targets mitochondria through activation of downstream effectors such as JNK.<sup>38,39</sup> Our data indicate first that I/R induced JNK phosphorylation, confirming previous findings,<sup>7</sup> and second that imipramine prevented JNK activation. Thus, the contribution of JNK to hepatic I/R damage may be mediated through ASMase-induced ceramide formation (Fig. 7B). In agreement with these findings, the potent activation of JNK (eightfold) by exogenous ASMase<sup>47</sup> has been reported in primary hepatocytes. Furthermore, the interaction of JNK with mitochondria has been reported during cell death,<sup>48,49</sup> opening the possibility that the role of JNK in hepatic I/R damage may be due to its interaction with mitochondria. However, the cytotoxic role of JNK may be attributable not only to its putative interaction with mitochondria but also to the activation of downstream targets, including BH3-only members of the Bcl-2 family such as Bim, which can be regulated by transcriptional and post-translational mechanisms.<sup>40,50</sup> Indeed, we have observed both the upregulation and phosphorylation of Bim<sub>L</sub>, a Bim splice variant normally associated with microtubules through its interaction with the dynein light chain 1 that prevents its interaction with other Bcl-2 family members.<sup>50</sup> The phosphorylation of Bim<sub>L</sub> at threonine56 by JNK unleashes Bim<sub>L</sub> from microtubules, allowing its redistribution and binding to Bcl-2.<sup>50</sup> Consistent with this mechanism, we have observed the phosphorylation of Bim<sub>L</sub> and its translocation to mitochondria during I/R, in agreement with previous findings in lung cancer cells,<sup>40</sup> and this step was prevented by JNK inhibition (SP600125) or ASMase inhibition (imipramine) (Fig. 6D). Moreover, Bak has been involved in hepatic I/R injury in a JNK-dependent fashion,<sup>7</sup> and hence we do not discard the participation of members of the Bcl-2 family of proteins. Thus, overall our findings indicate that the modulation of ceramide generation by ASMase during I/R regulates the mitochondrial pathway of hepatocellular death through JNK activation and subsequent mitochondrial translocation of Bim<sub>L</sub>, suggesting that the modulation of ceramide may be a novel therapeutic approach to prevent post-ischemic liver injury.

**Acknowledgment:** The authors thank Susana Núñez for expert technical assistance. M. Marí, and A. Morales are Ramón y Cajal investigators.

## References

1. Bajt M, Farhood A, Jaeschke H. Effects of CXC chemokines on neutrophil activation and sequestration in hepatic vasculature. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G1188-G1195.
2. Zwacka RM, Zhang Y, Halldorson J, Schlossberg H, Dudus L, Engelhardt JF. CD4(+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. *J Clin Invest* 1997;100:279-289.

3. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology* 1991;13:83-95.
4. Luedde T, Assmus U, Wustefeld T, Meyer zu Vilsendorf A, Roskams T, Schmidt-Supprian M, et al. Deletion of IKK2 in hepatocytes does not sensitize these cells to TNF-induced apoptosis but protects from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2005;115:849-859.
5. Colletti LM, Remick DG, Burch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA Jr. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest* 1990;85:1936-1943.
6. Rudiger HA, Clavien PA. Tumor necrosis factor  $\alpha$ , but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology* 2002;122:202-210.
7. Uehara T, Bennett B, Sakata ST, Satoh Y, Bilter GK, Westwick JK, et al. JNK mediates hepatic ischemia reperfusion injury. *J Hepatol* 2005;42:850-859.
8. Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 2003;125:1246-1257.
9. Hannun YA, Luberto C. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol* 2000;10:73-80.
10. Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Fernandez-Checa JC. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species: role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem* 1997;272:11369-11377.
11. Kolesnick RN, Kronke M. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998;60:643-665.
12. Scarlatti F, Bauvy C, Ventruiti A, Sala G, Cluzeaud F, Vandewalle A, et al. Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *J Biol Chem* 2004;279:18384-18391.
13. Merrill AH Jr. De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem* 2002;277:25843-25846.
14. Cremesti AE, Goni FM, Kolesnick R. Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome? *FEBS Lett* 2002;531:47-53.
15. Paris F, Grassme H, Cremesti A, Zager J, Fong Y, Haimovitz-Friedman A, et al. Natural ceramide reverses Fas resistance of acid sphingomyelinase(-/-) hepatocytes. *J Biol Chem* 2001;276:8297-8305.
16. Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Calvo M, Enrich C, et al. Defective TNF- $\alpha$ -mediated hepatocellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice. *J Clin Invest* 2003;111:197-208.
17. Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer* 2004;4:604-616.
18. Morita Y, Perez GI, Paris F, Miranda SR, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, et al. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat Med* 2000;6:1109-1114.
19. Morales A, Colell A, Mari M, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Glycosphingolipids and mitochondria: role in apoptosis and disease. *Glycoconj J* 2004;20:579-588.
20. Meng A, Luberto C, Meier P, Bai A, Yang X, Hannun YA, et al. Sphingomyelin synthase as a potential target for D609-induced apoptosis in U937 human monocytic leukemia cells. *Exp Cell Res* 2004;292:385-392.
21. Strelow A, Bernardo K, Adam-Klages S, Linke T, Sandhoff K, Kronke M, et al. Overexpression of acid ceramidase protects from tumor necrosis factor-induced cell death. *J Exp Med* 2000;192:601-612.
22. Maceyka M, Payne SG, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002;1585:193-201.
23. Teoh N, Field J, Sutton J, Farrell G. Dual role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in hepatic ischemia-reperfusion injury: studies in tumor necrosis factor- $\alpha$  gene knockout mice. *HEPATOLOGY* 2004;39:412-421.
24. Bradham CA, Stachlewitz RF, Gao W, Qian T, Jayadev S, Jenkins G, et al. Reperfusion after liver transplantation in rats differentially activates the mitogen-activated protein kinases. *HEPATOLOGY* 1997;25:1128-1135.
25. Alessenko AV, Galperin EI, Dudnik LB, Korobko VG, Mochalova ES, Platonova LV, et al. Role of tumor necrosis factor  $\alpha$  and sphingomyelin cycle activation in the induction of apoptosis by ischemia/reperfusion of the liver. *Biochemistry (Mosc)* 2002;67:1347-1355.
26. Mari M, Colell A, Morales A, Paneda C, Varela-Nieto I, Garcia-Ruiz C, et al. Acidic sphingomyelinase downregulates the liver-specific methionine adenosyltransferase 1A, contributing to tumor necrosis factor-induced lethal hepatitis. *J Clin Invest* 2004;113:895-904.
27. Garcia-Ruiz C, Mari M, Morales A, Colell A, Ardite E, Fernández-Checa JC. Human placenta sphingomyelinase, an exogenous acidic pH-optimum sphingomyelinase, induces oxidative stress, glutathione depletion, and apoptosis in rat hepatocytes. *HEPATOLOGY* 2000;32:56-65.
28. Nikolova-Karakashian M, Morgan ET, Alexander C, Liotta DC, Merrill AH Jr. Bimodal regulation of ceramidase by interleukin-1 $\beta$ . Implications for the regulation of cytochrome p450 2C11. *J Biol Chem* 1997;272:18718-18724.
29. Veldman RJ, Mitta A, Cuvillier O, Garcia V, Klappe K, Medina JA, et al. The absence of functional glucosylceramide synthase does not sensitize melanoma cells for anticancer drugs. *FASEB J* 2003;17:1144-1146.
30. Paris R, Morales A, Coll O, Sanchez-Reyes A, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Ganglioside GD3 sensitizes human hepatoma cells to cancer therapy. *J Biol Chem* 2002;277:49870-49876.
31. Song E, Lee SK, Wang, J, Ince N, Ouyang N, Min J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 2003;9:347-351.
32. Zender L, Hutker S, Liedtke C, Tillmann HL, Zender S, Mundt B, et al. Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7797-7802.
33. Hurwitz R, Ferlinz K, Sandhoff K. The tricyclic antidepressant desipramine causes proteolytic degradation of lysosomal sphingomyelinase in human fibroblasts. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1994;375:447-450.
34. Sugita M, Williams M, Dulaney JT, Moser HW. Ceramidase and ceramide synthesis in human kidney and cerebellum: description of a new alkaline ceramidase. *Biochim Biophys Acta* 1975;398:125-31.
35. Ikegami M, Dhami R, Schuchman EH. Alveolar lipoproteinosis in an acid sphingomyelinase-deficient mouse model of Niemann-Pick disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284:L518-L525.
36. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413:732-738.
37. Heidel JD, Hu S, Liu XF, Triche TJ, Davis ME. Lack of interferon response in animals to naked siRNAs. *Nat Biotechnol* 2004;22:1579-1582.
38. Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, et al. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 1996;380:75-79.
39. Westwick JK, Bielawska AE, Dbaibo G, Hannun YA, Brenner DA. Ceramide activates the stress-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1995;270:22689-22692.
40. Kurinna SM, Tsao CC, Nica AF, Jiffar T, Ruvolo PP. Ceramide promotes apoptosis in lung cancer-derived A549 cells by a mechanism involving c-Jun NH2-terminal kinase. *Cancer Res* 2004;64:7852-7856.
41. Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, et al. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:13681-13686.
42. Schmidt-Choudhury A, Furuta G, Lavigne J, Galil S, Wershil B. The regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  production in murine mast cells: pentoxifylline or dexamethasone inhibits IgE-dependent production of TNF- $\alpha$  by distinct mechanisms. *Cell Immunol* 1996;171:140-146.
43. He X, Okino N, Dhami R, Dagan A, Gatt S, Schulze H, et al. Purification and characterization of recombinant, human acid ceramidase: catalytic reactions and interactions with acid sphingomyelinase. *J Biol Chem* 2003;278:32978-32986.
44. Osawa Y, Uchinami H, Bielawska J, Schwabe RF, Hannun YA, Brenner DA. Roles for C16-ceramide and sphingosine 1-phosphate in regulating hepatocyte apoptosis in response to tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Biol Chem* 2005;280:27879-27887.

45. Baine CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinka H, Hambleton MA, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role of mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 2005;434:658-662.
46. Kagan VE, Tyurin VA, Jiang J, Tyurina YY, Ritov VB, Amoscato AA, et al. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol* 2005;1:223-232.
47. Gupta S, Natarajan R, Payne SG, Studer EJ, Spiegel S, Dent P, et al. Deoxycholic acid activates c-Jun N-terminal Kinase pathway via FAS receptor activation in primary hepatocytes. *J Biol Chem* 2004;279:5821-5828.
48. Aoki H, Kang PM, Hampe J, Yoshimura K, Noma T, Matsuzaki M, et al. Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2002;277:10244-10250.
49. Kharbanda S, Saxena S, Yoshida K, Pandey P, Kaneki M, Wang O, et al. Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x<sub>L</sub> in response to DNA damage. *J Biol Chem* 2000;275:322-327.
50. Ley R, Ewings KE, Hadfield K, Cook SJ. Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK. *Cell Death Differ* 2005;12:1008-1014.



REACTIVE OXYGEN SPECIES MEDIATE LIVER INJURY THROUGH  
PARENCHYMAL NF- $\kappa$ B INACTIVATION IN PROLONGED  
ISCHEMIA/REPERFUSION

**Laura Llacuna, Montserrat Marí, Josep M. Lluís, Carmen García-Ruiz, José C.  
Fernández-Checa, Albert Morales.**

Liver Unit, Hospital Clinic, IDIBAPS-CIBEK, CIBEREHD, and Department of Cell  
Death and Proliferation, IIBB-CSIC, Barcelona, Spain.

**Grant support:** The work presented was supported by the CIBEREHD and by grants FIS06/0395, FIS07/0193, SAF2008-02199 and SAF2006-06780 supported by Instituto de Salud Carlos III and Ministry of Science and Innovation from Spain, and by a grant from the Research Center for Liver and Pancreatic Diseases, P50 AA 11999 funded by the US National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism.

Running title: Dual role of NF- $\kappa$ B in liver I/R injury

Number of text pages: 31

Tables: 0

Figures: 8

Corresponding author: Albert Morales, [amorales@clinic.ub.es](mailto:amorales@clinic.ub.es), and José C. Fernandez-Checa, [checa229@yahoo.com](mailto:checa229@yahoo.com).

Phone# 00-34-93-2275709, Fax# 00-34-93-4515272

Albert Morales and José C. Fernandez-Checa share senior authorship.

## SUMMARY

NF- $\kappa$ B participates in ischemia/reperfusion (I/R) hepatic signaling, stimulating both protective mechanisms and the generation of inflammatory cytokines. In analyzing the pattern of NF- $\kappa$ B activation during increasing times of ischemia in murine I/R, we observed that the nuclear translocation of p65 paralleled Src and I $\kappa$ B tyrosine phosphorylation, which peaked after 60 min of ischemia. In extended ischemic periods (90-120 min), however, nuclear p65 levels inversely correlated with the progressive induction of oxidative stress. Despite this profile of NF- $\kappa$ B activation, inflammatory genes such as TNF and IL-1 $\beta$ , predominantly induced by Kupffer cells, increased over time during ischemia (30-120 min), whereas protective NF- $\kappa$ B-dependent genes such as Mn-SOD, expressed in parenchymal cells, decreased. Consistent with this behavior, gadolinium chloride pretreatment abolished TNF/IL-1 $\beta$  upregulation during ischemia without affecting that of Mn-SOD. Interestingly, specific glutathione (GSH) upregulation in hepatocytes by S-adenosylmethionine increased Mn-SOD expression and protected against I/R-mediated liver injury despite TNF/IL-1 $\beta$  induction. Similar protection was achieved by administration of the SOD mimetic MnTBAP. In contrast, indiscriminated hepatic GSH depletion by buthionine-sulfoximine (BSO) prior to I/R potentiated oxidative stress, decreased nuclear p65 levels and Mn-SOD expression, increasing TNF/IL-1 $\beta$  upregulation and I/R-induced liver damage. Thus, the divergent role of NF- $\kappa$ B activation in selective liver cell populations underlies the dichotomy of NF- $\kappa$ B in hepatic I/R injury, illustrating the relevance of strategies that specifically maintain NF- $\kappa$ B activation in parenchymal cells.

## INTRODUCTION

Liver damage induced by ischemia/reperfusion (I/R) is of relevance in different clinical settings such as liver resection, transplantation, trauma or hemorrhagic shock, in which NF- $\kappa$ B activation plays a controversial role due to its dual action in the induction of both protective and pro-inflammatory genes (1-2). For instance, hepatic NF- $\kappa$ B activation has been shown to diminish hepatic I/R injury and improve orthotopic liver transplantation, while NF- $\kappa$ B inactivation has been shown to protect against hepatic I/R (3-6). These diverse and seemingly discordant results have been explained on the basis of different degree of residual NF- $\kappa$ B activation achieved depending on the mechanisms used to block NF- $\kappa$ B activation. Thus, while a total block of NF- $\kappa$ B may be detrimental as it prevents expression of survival genes, an incomplete NF- $\kappa$ B inhibition may suppress the upregulation of proinflammatory mediators, while allowing the induction of protective genes. In addition, whether this dichotomy of NF- $\kappa$ B in promoting or protecting against hepatic I/R injury reflects the expression of NF- $\kappa$ B-dependent genes in different hepatic cell populations, such as parenchymal and Kupffer cells, remains largely unknown.

In the liver, TNF, reactive oxygen species (ROS) and Toll-like receptors (TLR) are major players in NF- $\kappa$ B activation (7-9). TNF upon binding to its membrane receptor TNF-R1 induces DISC recruitment, IKK activation, I $\kappa$ B serine phosphorylation and subsequent proteasome degradation after ubiquitination (10). As a consequence, NF- $\kappa$ B is released from its inhibitory subunit allowing the transcription of target genes. This canonical pathway of NF- $\kappa$ B activation is also followed upon engagement of Toll-like receptors (TLRs), a family of receptors that play a key role in innate immune responses as well as

in inflammation (11). Moreover, TLRs, particularly TLR4, is drawing current attention as an important mediator of hepatic I/R injury (12-13).

It has been shown that the generation of intracellular ROS activates Src tyrosine kinases leading to the phosphorylation of I $\kappa$ B at tyrosine residues, resulting in the dissociation of the p50-p65 heterodimer from its inhibitory I $\kappa$ B subunit followed by its nuclear translocation (14-17). In addition, the Src-mediated mechanism of NF- $\kappa$ B activation by I $\kappa$ B tyrosine phosphorylation has also been described during hypoxia in various cell types, including hepatocytes (18-20). Moreover, recent data have shown that NF- $\kappa$ B transactivation is diminished in hepatocytes following GSH depletion, involving IKK dependent and independent mechanisms (21) and that GSSG generation, such as that caused by ROS overgeneration, inactivates NF- $\kappa$ B (22). Since ROS production could interfere with the synthesis of protective NF- $\kappa$ B-dependent genes in the liver, antioxidant therapies that increase NF- $\kappa$ B-dependent gene transcription in the hepatocyte, without promoting pro-inflammatory cytokines in non-parenchymal cells, particularly in Kupffer cells would be of interest to discriminate the role of NF- $\kappa$ B in hepatic I/R injury. In this regard, S-adenosylmethionine (SAM) is known to increase GSH levels in the hepatocyte through the transsulfuration pathway and shown to reduce ROS production in different liver pathologies, including I/R (23-26). Hence, the goal of this study was to examine the activation of NF- $\kappa$ B and the expression of protective and inflammatory target genes in relation with the length of ischemia during partial hepatic warm I/R and the influence of selective GSH loading in parenchymal cells.

Our work shows that SAM administration enhanced GSH stores in hepatocytes, decreasing ROS production, increasing the expression of NF- $\kappa$ B-dependent

cytoprotective genes and preserving the liver against I/R exposure. In contrast, GSH depletion increased the upregulation of proinflammatory genes and potentiated the hepatic damage induced by I/R. Therefore, our results suggest that, while indiscriminated NF- $\kappa$ B modulation may not produce the beneficial effects expected, therapies aimed to modulate the redox status of specific hepatic cells may increase selective  $\kappa$ B-dependent proteins and be more effective in protecting the liver against I/R induced injury.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Partial Hepatic Ischemia and Treatments-** The experimental animal protocol was approved by the IDIBAPS Animal Care and Use Committee. Hepatic partial warm ischemia was performed in male C57BL/6 mice using micro-vascular clamps (Biemer clip, 0.29-0.39 N) to prevent hepatic blood flow for different times (0-120 min) as described previously (27). Blood samples and liver biopsies were taken at different periods after reperfusion for further evaluation. Control animals were sham operated. Mice were pretreated 1 h prior to surgery with SAM (5 mg/mice, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), BSO (4 mmol/kg, Sigma-Aldrich), MnTBAP (50 mg/kg, Calbiochem, San Diego, CA), or with an equal volume of the vehicle. In some cases, gadolinium chloride was administered 24 h before surgery to antagonize Kupffer cells (28, 29).

**Hepatocyte and Kupffer cell isolation-** Primary hepatocytes were obtained from mouse liver by collagenase digestion and cultured on collagen-coated plates as described (23, 25). Kupffer cells (KC) isolation was performed by pooling nonparenchymal cells from 3 male mice (C57BL/6, 8-12 week old), using the method by *Smedsrod et al* (30). In brief, after 0.05% collagenase perfusion of the liver, the cell suspension was centrifuged at 50 x g for two minutes to separate parenchymal from nonparenchymal cells. The supernatant, which contains nonparenchymal cells, was centrifuged (300 x g; 4 min; 4°C) to concentrate the cells, followed by centrifugation (800 x g; 10 min; 4°C) through a two-step Percoll gradient (25% + 50%), with the Kupffer cells and endothelial cells banding at the interface between the two density cushions. The pellet was suspended at  $4 \times 10^6$  cells/ml in DMEM medium supplemented with 20% heat-inactivated FBS, 100 IU/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. Separation of pure Kupffer cells and endothelial

cells was obtained due the selective adherence of Kupffer cells to plastic flasks after 60 min of incubation, yielding 2 to 3 million KC per mouse liver, with 90-95% viability as determined by trypan blue exclusion. The cells showed typical macrophage morphologic features and stained positively for F4/80. Macrophage cell line RAW 264.7, supplied by ECACC (Sigma-Aldrich), was routinely growth at 37° and 5% CO<sub>2</sub> in DMEM medium with 10% FBS under normoxic atmosphere. Primary hepatocytes, Kupffer and RAW 264.7 cells were exposed either to hypoxia (0.5% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>), TNF (Peprotech EC, London, UK) or LPS (Sigma-Aldrich) for the indicated periods. In some cases, hepatocytes were treated with 10 µM 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazole[3, 4-d]pyrimidine (PP2), and 100 µM piceatannol (Calbiochem) before exposure to hypoxia as described (19) and RAW 264.7 cells were pre-exposed to acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal (Calbiochem) to inhibit the proteasome before exposure to LPS .

**Western Blotting and nuclear extracts preparation-** The phosphorylation of c-Src was analyzed in liver homogenates using phospho-Src (Tyr416) from Cell Signaling (Danvers, MA). To evaluate tyrosine phosphorylation of IκB-α after I/R, 1 mg of whole-liver lysate was immunoprecipitated using 2 µg of an IκB-α Ab (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) and determined with anti-phosphotyrosine Ab (Santa Cruz Biotech). Mn-SOD and TNF protein levels were analyzed in total liver extracts using commercial antibodies (Santa Cruz Biotech), while NF-κB activation was analyzed in nuclear extracts using p65 Ab (Santa Cruz Biotech). Nuclear extracts from liver samples were prepared as previously described (19).

**Measurement of Plasma TNF Levels-** Whole blood obtained by cardiac puncture was centrifuged and 50 µl of plasma aliquots were frozen for TNF assay. Plasma TNF levels

were determined by an enzyme-linked immunosorbent assay using a commercial kit (Quantikine M Murine Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Assay; R&D Systems, Minneapolis, MN).

**Liver damage-** After reperfusion, livers were fixed and sections (5  $\mu$ m) were stained with hematoxylin and eosin using standard methods, examining the slides with a Zeiss Axioplan microscope equipped with a Nikon DXM1200F digital camera. Serum ALT levels were measured by the Centro de Diagnóstico Medico (Hospital Clinic, Barcelona).

**Real-time Polymerase Chain Reaction-** Total RNA was isolated from mouse liver samples with the TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Real-time PCR was performed using the 2x SensiMix One-Step Kit with SYBR<sup>®</sup> Green (Quantance, London, UK) following the manufacturer instructions. Threshold (CT) values for each mRNA were subtracted from that of 18S mRNA, averaged and converted from log-linear to linear term. The primer sequences used for 18s, cIAP-2, Mn-SOD, TNF and IL-1 $\beta$  amplification were as follows:

cIAP-2 forward      5'- GTGGAACATGCCAAGTGGTT -3';

cIAP-2 reverse      5'- GGAGGCAATACAGCATTGGT -3';

Mn-SOD forward    5'- AACTCAGGTCGCTCTTCAGC-3';

Mn-SOD reverse    5'- GAACCTTGGACTCCCACAGA-3';

TNF forward        5'-CTGAACTTCGGGGTGATCGGT -3';

TNF reverse        5'-ACGTGGGCTACAGGCTTGTC -3';

IL-1 $\beta$  forward      5'-GAGCTGAAAGCTCTCCACCTC -3';

IL-1 $\beta$  reverse      5'- CTTTCCTTTGAGGCCCAAGGC-3';

18S forward        5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT -3';



18S reverse            5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG -3'.

**Lipid peroxidation assay-** Lipid peroxidation in liver samples was determined following the production of malondialdehyde (MDA) using the thiobarbituric acid (TBA) method. Briefly, 0.4 ml of 0.6% TBA and 1.2 ml of 1% orthophosphoric acid were added to 100  $\mu$ l of liver homogenate and boiled for 45 minutes. After cooling, 1.6 ml of 1-butanol was added; samples were mixed and centrifuged at 1200 rpm for 10 minutes. MDA concentrations were determined in the supernatants by measuring the optical density at 535 nm using a calibrated curve with TBA as standard.

**Myeloperoxidase assay-** Myeloperoxidase (MPO), an enzyme predominantly found in the azurophilic granules of polymorphonuclear leukocytes (PMN), was used as an index of neutrophil accumulation in the liver. Tissue homogenates were assayed with o-dianisidine solution (43.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 mM EDTA, 0.016% o-dianisidine, 0.001%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ); pH 6). Oxidized o-dianisidine forms a stable chromophore, which is detected by measuring the absorbance at 460 nm. In parallel, MPO staining in liver samples was determined by immunohistochemistry as previously described (31).

**Assessment of hepatic reactive oxygen species (ROS) content-** Hepatic ROS content was measured using 2'-7'-dichlorofluorescein (DCF). Briefly, 10  $\mu$ l of liver homogenates, diluted 100-fold with phosphate-buffered saline (pH 7.4), were loaded with 5  $\mu$ M DCF and incubated at 37°C for 30 min. Fluorescence was measured at excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 530 nm as previously described (19).

**Statistical Analysis-** Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation with the number of individual experiments detailed in Figure legends. Statistical significance was established by the Student's t test.

## RESULTS

### **Time-dependent oxidative stress and TNF secretion during I/R.**

ROS and TNF are important players in different liver pathologies, such as hepatic I/R injury and are known to modulate NF- $\kappa$ B activation. Therefore, we decided to measure parameters related to oxidative stress and TNF production as a function of the length of hepatic ischemia to ultimately examine their impact on NF- $\kappa$ B-dependent gene expression and liver injury. Hepatic ischemia was induced for various time periods (0 to 120 min), taking liver samples at the end of the reperfusion phase (1 hour). ROS production increased progressively as the time of ischemia was extended (Fig. 1A). Even during short-time ischemia (30 min), substantial intracellular oxidative stress was detectable, as shown by the significant increase in the GSSG levels (Fig. 1B), which affected the GSH/GSSG ratio (not shown) and the rise of lipid peroxidation (Fig. 1C). In addition, as the time of ischemia increased, the levels of ROS, MDA and GSSG were progressively elevated in samples from reperfused livers. Furthermore, in parallel with these changes, there was a significant rise in TNF levels detectable after 1 hour of ischemia that kept rising with extended ischemic periods (Fig. 1D). These data underscore the induction of oxidative stress as a function of the time of ischemia following reperfusion.

### **Expression of $\kappa$ B-dependent proinflammatory and survival genes during I/R.**

Next, we examined the time course of NF- $\kappa$ B activation assessed as nuclear p65 translocation. Interestingly, the nuclear p65 levels measured after 1 hour of reperfusion exhibited a dual pattern depending on the time of ischemia, increasing when ischemia

was performed for up to 1 hour, but decreasing when the livers were clamped for longer periods of times (Fig. 2A). Since tyrosine kinases, particularly Src, have been involved in NF- $\kappa$ B activation (18, 19), we examined its activation reflected as Src phosphorylation at tyrosine 416. As seen, Src phosphorylation displayed a similar time-dependent pattern during ischemia as the nuclear translocation of p65 (Fig. 2A). Indeed, a parallel increase in I $\kappa$ B- $\alpha$  tyrosine phosphorylation was detected by immunoprecipitation from liver extracts after different ischemia periods (Fig. 2A).

Since nuclear levels of p65 in hepatocytes do not necessarily reflect the transactivation of NF- $\kappa$ B in the face of substantial oxidative stress and GSH depletion (21), we next analyzed the pattern of activation of diverse  $\kappa$ B target genes as a function of the time of ischemia. As seen, the mRNA levels of proinflammatory  $\kappa$ B-dependent genes such as TNF and IL-1 $\beta$  were upregulated with increasing ischemic periods (Fig. 2B). In contrast, we observed that the mRNA levels of  $\kappa$ B-dependent survival genes such as cIAP-2 increased moderately. Interestingly, the Mn-SOD mRNA levels increased for the first 30 minutes of ischemia, decreasing thereafter (Fig. 2C). Moreover, we examined the protein expression of Mn-SOD and TNF in liver samples by western blots to validate the results observed at the mRNA level. As seen (Fig. 2A), Mn-SOD decreased as a function of the period of hepatic ischemia, while TNF levels increased thus matching the data obtained by mRNA analysis. The contrast in the time-dependent upregulation of mRNA levels of proinflammatory vs. survival genes may reflect the activation of NF- $\kappa$ B in specific hepatic cell types. To test this, we examined Src phosphorylation and IL-1 $\beta$  mRNA expression in primary mouse hepatocytes and Kupffer cells in response to hypoxia, LPS or TNF exposure. As seen, hypoxia *per se* time-dependently phosphorylated Src at

tyrosine 416 in primary mouse hepatocytes (Fig. 3A), but not in Kupffer cells (Fig. 3B). Indeed, the macrophage cell line RAW 264.7, a surrogate cell line for Kupffer cells, exhibited similar results (Supplemental Fig. 1). Consistent with our previous results in HepG2 cells (19), preincubation of primary isolated hepatocytes with PP2, a selective Src inhibitor, but not piceatannol, prevented hypoxia-induced Src phosphorylation at tyrosine 416 and p65 nuclear migration (data not shown). In addition, Kupffer cells failed to phosphorylate Src in response to LPS (Fig. 3B) or TNF (not shown), despite strong induction of pro-inflammatory genes such as IL-1 $\beta$  in response to LPS and TNF exhibited (Fig. 3C, D). Moreover, RAW 264.7 macrophages, displayed increased IL-1 $\beta$  transcription after LPS or TNF exposure (Supplemental Fig. 2). Moreover, LPS-induced NF- $\kappa$ B activation in RAW 264.7 cells was accompanied by I $\kappa$ B degradation that was prevented by proteasomal inhibition with acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal (not shown). In contrast, LPS and TNF failed to upregulate IL-1 $\beta$  in primary hepatocytes (Fig. 3C, D). Thus, these data suggest that the activation of NF- $\kappa$ B via Src phosphorylation following I/R occurs in hepatocytes, and that Kupffer cells are the predominant source of proinflammatory cytokines.

#### **Kupffer cells inactivation downregulates TNF/IL-1 $\beta$ production during I/R.**

Since the preceding findings indicated that the upregulation of proinflammatory cytokines derived mainly from macrophages, we next examined the contribution of Kupffer cells in this process during I/R using gadolinium chloride to specifically abrogate their activity *in vivo* (9, 28, 29). Mice were injected i.p. with gadolinium chloride (10 mg/Kg) 24 hours before 90 min of ischemia and 6 hours post-reperfusion. Confirming previous findings, Kupffer cells inactivation protected against I/R-mediated liver injury,

estimated by the reduction of serum ALT/AST (Fig. 4A). Of note, this outcome was accompanied by the downregulation of mRNA levels of TNF and IL-1 $\beta$  (Fig. 4B). However, the Mn-SOD and cIAP-2 mRNA levels were either not affected or slightly increased during I/R following gadolinium chloride treatment (Fig. 4C), indicating that the predominant source of TNF/IL-1 $\beta$  during I/R are Kupffer cells and that parenchymal cells are likely major contributors in the upregulation of  $\kappa$ B-dependent protective genes.

**SAM therapy selectively boosts GSH stores in parenchymal cells protecting against I/R-mediated hepatic injury.**

Since NF- $\kappa$ B activation and Src phosphorylation have been proved to depend on ROS production in hepatocytes and since GSH is a major antioxidant, we decided to specifically increase GSH levels in parenchymal cells by treating mice with SAM before I/R. SAM's capacity to increase GSH levels is relevant in specific tissues such as liver or kidney in which the transsulfuration pathway allows the conversion of homocysteine to cysteine (32). Given that methionine adenosyltransferases (MATs) are suggested to be expressed in Kupffer cells and hepatic endothelial cells (33), we first assessed whether exogenous SAM boosts GSH levels in Kupffer cells and in isolated hepatocytes. Mouse hepatocytes displayed increased GSH content (Fig. 5A) 4 hours after the administration of SAM (2 mM). In contrast, the content of GSH in Kupffer cells did not change after SAM exposure (Fig. 5B). However, the incubation with BSO, a specific inhibitor of  $\gamma$ -GCS, which catalyzes the rate-limiting step in GSH biosynthesis, significantly decreased GSH to a similar extent in both cell types (Fig. 5A, B). As expected from the data with

Kupffer cells, BSO decreased GSH levels in RAW 264.7 cells while SAM did not exert any change in GSH content (Supplemental Fig. 3).

Next, we examined the effects of these strategies *in vivo* during I/R. Compared to I/R, SAM treatment was effective in replenishing hepatic GSH levels, which decreased in untreated samples following 90 min of ischemia and 6 hours post-reperfusion (Fig. 6A). In contrast, BSO pretreatment further decreased hepatic GSH levels during I/R, thus compromising the hepatic capacity to cope with oxidative stress during I/R. Consequently, SAM therapy efficiently prevented the increase in lipid peroxidation measured as MDA levels during I/R, while BSO treatment further enhanced this effect (Fig. 6B). Consistent with these findings, ALT levels were reduced in SAM-treated animals following I/R (Fig. 6D), indicative of lower liver injury as observed by H&E (Fig. 6C) staining compared to untreated control mice subjected to I/R. In contrast, massive hepatic damage examined by H&E (Fig. 6C) and ALT (Fig. 6D) was observed in BSO-pretreated mice during I/R. In addition, and consistent with the above findings, we observed a differential effect of SAM vs. BSO pretreatment in the extent of neutrophil infiltration during I/R as measured by myeloperoxidase (MPO) enzymatic activity (Fig. 6E) and immunohistochemistry (Fig. 6F). Finally, to assess if the protective effect of SAM administration against I/R-mediated liver injury was dependent or not on GSH biosynthesis, we tested whether BSO abrogated the therapeutic effect of SAM pretreatment. Indeed, we observed that the serum ALT levels following I/R in mice treated with SAM plus BSO were similar to the group of mice pretreated with BSO alone (data not shown), indicating that the beneficial effect of SAM during I/R was dependent on the increase in parenchymal GSH stores.

**Differential effects of SAM and BSO on TNF/IL-1 $\beta$  and Mn-SOD/cIAP-2 expression during I/R.**

To evaluate if the changes in the liver redox status following SAM and BSO influence the degree of NF- $\kappa$ B activation during I/R, we analyzed the nuclear levels of p65, the transactivating subunit of the NF- $\kappa$ B heterodimer p50-p65, after 1 hour of reperfusion. As observed in Fig. 7A, the nuclear translocation of p65 induced by I/R increased in SAM-treated mice, while GSH depletion in mice following BSO pretreatment diminished p65 nuclear levels during I/R. In addition, the levels of Src phosphorylation at tyrosine 416 after 90 min of ischemia were induced in SAM-treated animals, while BSO administration reduced phospho-Src levels, pointing again to Src tyrosine phosphorylation as the mainly mechanism involved in the observed NF- $\kappa$ B activation. SAM treatment alone in sham-operated mice did not affect the nuclear levels of p65 or Src phosphorylation at tyrosine 416 (data not shown). Moreover, total liver extracts after 90 minutes of ischemia followed by 6 hours of reperfusion displayed higher Mn-SOD protein levels in SAM-administered mice, suggesting an increased synthesis of this protective gene, while TNF was moderately enhanced in BSO-treated mice (Fig. 7A).

To analyze whether these changes in protein expression were reflected at the mRNA level, next we examined the effect of GSH modulation on NF- $\kappa$ B-dependent gene expression following I/R. We observed a significant increase in the expression of cIAP and Mn-SOD mRNA levels after SAM administration compared to the changes observed after GSH depletion following BSO injection (Fig. 7B). Interestingly, TNF and IL-1 $\beta$  mRNA levels were unaffected by SAM administration, although these levels increased in BSO-pretreated mice before I/R (Fig. 7C), suggesting a differential regulation of NF- $\kappa$ B-

dependent gene expression in parenchymal and non-parenchymal cells. Besides, in RAW 264.7 macrophages incubated with LPS or TNF, pre-administration of SAM did not induced significant changes in the activation of these proinflammatory genes (data not shown).

Mn-SOD, the  $\kappa$ B-dependent mitochondrial SOD isoform, has a relevant role in liver protection against diverse hepatotoxic stimuli that induce oxidative stress, such as I/R (7, 34). In this regard, we have recently observed that Mn-SOD expression protects hepatoma cells under severe hypoxic conditions (18). Since Mn-SOD mRNA was increased in SAM-treated animals, we examined whether a Mn-SOD mimetic such as MnTBAP reproduces the protection observed in SAM-treated mice against I/R-induced liver damage. As seen, MnTBAP-treated animals were protected against I/R exposure examined by ALT serum levels (Fig. 7D) as well as H&E and TUNEL staining (not shown). Collectively, these data suggest that strategies aimed to selectively activate NF- $\kappa$ B in parenchymal cells may be of relevance in I/R-mediated liver damage.



## DISCUSSION

As a master regulator of inflammation and survival pathways, NF- $\kappa$ B participates in both protective mechanisms and the generation of inflammatory cytokines whose balance ultimately controls the fate of the liver during I/R. As a result, although NF- $\kappa$ B signaling has become a potential therapeutic target to control and maintain hepatic function after I/R, conflicting results have been reported in which both NF- $\kappa$ B activation and inactivation protected against hepatic I/R injury (3-6). Our present work proposes that opposite effects of NF- $\kappa$ B after I/R are determined by distinctive mechanisms in parenchymal and non-parenchymal cells, which control autonomous NF- $\kappa$ B activation that affects separate sets of genes (Fig. 8). Our results point to the ROS-mediated Src-dependent mechanism of NF- $\kappa$ B activation as a predominant pathway acting in hepatocytes, which is in charge for the induction of protective genes essential in the maintenance of liver function. In contrast, in non-parenchymal cells, particularly Kupffer cells the induction of  $\kappa$ B-dependent pro-inflammatory genes most likely involves I $\kappa$ B serine-phosphorylation and proteasomal degradation. This canonical activation of NF- $\kappa$ B in Kupffer cells triggered by I/R through ligands such as TNF or LPS would be consistent with the liver protection observed in knockout models that block this receptor-mediated signaling (5, 6, 8, 35) or after Kupffer cell inactivation (9, 28, 29).

On the other hand, ROS generation after I/R is responsible for the induction of Src-phosphorylation, NF- $\kappa$ B activation and transcription of  $\kappa$ B-dependent protective genes in the hepatocyte, such as Mn-SOD. This outcome is consistent with our previous findings indicating that hypoxia induced mitochondrial ROS, which played a signaling role in Src activation (19). However, extended ischemia induces a massive production of ROS and

GSSG generation, which antagonizes NF- $\kappa$ B reflected by decreased nuclear p65 levels and downregulation of  $\kappa$ B-dependent survival genes such as Mn-SOD or cIAP-2. This is consistent with the notion that NF- $\kappa$ B activation requires a balanced level of GSSG (22). Paralleling these effects on nuclear p65 translocation, we observe the dual regulation of Src phosphorylation during I/R-mediated ROS generation. While this activation during the early phase of ischemia fits with our previous finding in hypoxia (19), the decrease in Src phosphorylation at later times may reflect the activation of tyrosine phosphatases, although this remains to be established. This dual role of ROS in I/R signaling, depending on the duration of the ischemia, is consistent with the observation that the suppression of oxidative stress generated during ischemic preconditioning is sufficient to cancel the protective mechanisms triggered by preconditioning, including Mn-SOD overexpression (36, 37).

Mn-SOD is a critical enzyme in cellular protection acting as a first line of defense against superoxide anion generation, and consistent with this function Mn-SOD has been positioned as a decisive player against ischemic damage in different organs including the liver (34, 38-40). Although we did not assess the source of ROS generation (mitochondrial vs. extramitochondrial) during extended ischemia, consistent with the key protective role of Mn-SOD previous studies pointed to mitochondria as a major source for the burst of ROS during I/R or hypoxia (19, 41). The scavenging of superoxide anion by Mn-SOD will be expected to yield hydrogen peroxide, which needs to be detoxified by the GSH redox cycle in the mitochondrial matrix. If the latter is compromised by impaired GSH peroxidase or GSH reductase or by limited GSH levels, it may result in higher hydrogen peroxide accumulation. Interestingly, SAM treatment will be expected

to prevent GSH depletion not only in the cytosol via its conversion into cysteine in the transsulfuration pathway (32), but also to increase mitochondrial GSH levels from the transport of cytosol GSH (23, 42). Consistent with the onset of oxidative stress during I/R, antioxidant strategies have been proved useful against I/R-mediated organ damage (31, 38, 41, 43-46). Although MATs have been recently described in non-parenchymal cells (33), SAM conversion into GSH is only observed in parenchymal cells and this selectivity underscores the differential involvement of ROS in NF- $\kappa$ B-dependent gene regulation in parenchymal and non-parenchymal cells and their role in hepatic I/R injury. Thus, in non-parenchymal cells during extended times of ischemia, the increased transcription of  $\kappa$ B-dependent inflammatory cytokines are not affected by SAM administration but are significantly reduced by Kupffer cells inactivation. Interestingly, the liver protection observed after gadolinium treatment is accomplished almost exclusively by reducing the generation of inflammatory proteins, without inducing any decline in the levels of protective  $\kappa$ B-dependent genes in parenchymal cells, such as Mn-SOD.

The above findings imply a careful regulation and/or modulation of NF- $\kappa$ B due to its complexity, diverse mechanisms of activation and cellular heterogeneity. Several posttranslational modifications of p65 caused by different stimuli, particularly serine-phosphorylation and acetylation, may affect its affinity for specific domains located in the promoter of responsive genes (10, 47). It is also proposed that NF- $\kappa$ B-regulated genes should be divided into groups depending on their requirement for chromatin modification for expression (48). Particularly, chromatin remodeling and histone acetylation have been shown to facilitate Mn-SOD transcription in response to TNF (48). Nevertheless, our

results may help to appreciate that NF- $\kappa$ B signaling in the liver should be analyzed in particular cell types, and research approaches should take into account this autonomous behavior. Although in a different setting, *Takahashi et al* described a dual activation profile of NF- $\kappa$ B during cold I/R-mediated liver injury (49), differentiating an early and a late phase of NF- $\kappa$ B activation. However, these investigators did not pursue whether selective liver cell populations contributed to the divergent role of NF- $\kappa$ B in cold ischemia.

In conclusion, since Src-mediated NF- $\kappa$ B activation in hepatocytes is induced by ROS generated after I/R, the NF- $\kappa$ B-dependent synthesis of protective proteins produced during short-time ischemia may be at risk by maneuvers aimed to diminish ROS-production. In contrast, at prolonged time of ischemia the transcription of NF- $\kappa$ B-dependent protective genes may be compromised. In this scenario, the antagonism of oxidant species produced in hepatocytes during long ischemia by antioxidant-based strategies will preserve the levels of protective genes, such as Mn-SOD, to promote the integrity of the liver.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1. Variation of intracellular oxidative stress and TNF levels in liver after ischemia. Samples were taken from animals exposed to different times of ischemia (30, 60, 90 and 120 min or sham operated used as controls). After one hour of reperfusion, ROS production (A), levels of reduced and oxidized glutathione (B), and MDA (C) were measured in liver samples, while TNF levels (D) were analyzed in serums from I/R-treated mice. (n ≥ 3) \**P* < 0.05 vs. sham-operated mice.

Figure 2. Time-dependent increase of nuclear p65, Src phosphorylation and  $\kappa$ B-dependent gene expression. In A, nuclear translocation of p65, phosphorylation of Src and tyrosine phosphorylation of I $\kappa$ B were measured after one hour of reperfusion in livers samples from mice exposed to different times of ischemia. A representative blot is shown (n = 3). Quantification of the levels of p65 and ratio p-Src/Src are included. (n = 3) \**P* < 0.05 vs. sham-operated mice. Protein levels of Mn-SOD and TNF were examined in total liver extracts after 6 hours of sham-operation or reperfusion (A). mRNA levels of NF- $\kappa$ B-dependent proinflammatory (B) and antiapoptotic (C) genes were measured 6 hours after different times of ischemia and normalized by 18S mRNA levels.

Figure 3. Primary hepatocytes and Kupffer cells display different response in NF- $\kappa$ B activation following I/R-related stimuli. A, Increased Src phosphorylation was observed in hypoxic hepatocytes (0.5% O<sub>2</sub>), but not after LPS exposure (2 h, 0.1 ng/ml), as shown in the upper panel. B, the levels of pTyr416Src were not increased in Kupffer cells after exposure to hypoxia or LPS. Representative blots are shown (n = 2). C and D, changes in IL-1 $\beta$  mRNA levels in hepatocytes and Kupffer cells after LPS (4 h, 0.1 ng/ml) and TNF

(4 h, 250 ng/ml) treatment (full bars) with respect to non-treated cells (empty bars), normalized by 18S mRNA levels. (n = 3) \**P* < 0.05 vs. control cells.

Figure 4. Effect of Kupffer cells inactivation by gadolinium chloride on hepatic I/R injury and  $\kappa$ B-dependent gene expression. Mice pretreated with gadolinium chloride or vehicle for 24 hours were subjected to 90 minutes ischemia and 6 hours reperfusion. ALT levels in serum (A) and mRNA liver levels of inflammatory (B) and protective (C) genes were analyzed. (n = 3) \**P* < 0.05 vs. sham-operated mice; # *P* < 0.05 vs. I/R-treated mice.

Figure 5. GSH levels in hepatocytes and Kupffer cells. GSH concentration was measured in primary hepatocytes and Kupffer cells after 4 hours exposure to SAM (2 mM) or BSO (1 mM). (n = 2-3) \**P* < 0.05 vs. control cells.

Figure 6. Differential effects of SAM and BSO in GSH levels and liver injury after I/R. Hepatic GSH levels (A), MDA generation (B), and liver damaged measured by liver H&E staining (C) and ALT in serum (D) from vehicle-, SAM- and BSO-treated animals exposed to 90 minutes of ischemia after 6 hours of reperfusion. Neutrophil infiltration by MPO activity (E) and immunohistochemistry (F) were analyzed after 6 h of reperfusion. No changes in liver damage or neutrophil infiltration were observed in animals treated with SAM or BSO alone. (n  $\geq$  3) \**P* < 0.05 vs. sham-operated mice; # *P* < 0.05 vs. I/R-treated mice.

Figure 7. GSH restoration in liver after I/R increased p65 nuclear levels and the transcription of protective genes. SOD mimetic protected the liver against I/R-induced damage. Representative western blots of nuclear p65, p-Src and Src examined after 1 hour of reperfusion (A) (n = 3). Mn-SOD and TNF protein levels were analyzed 6 hours after sham-operation or reperfusion. mRNA quantification of protective (B) and

proinflammatory (C) NF- $\kappa$ B-dependent genes in liver samples from mice exposed to 90 min ischemia and 6 hours of reperfusion and pretreated with vehicle, SAM or BSO. ALT levels in serum (D) from vehicle- or MnTBAP-treated mice and exposed to I/R as above. (n = 3) \* $P < 0.05$  vs. sham-operated mice; #  $P < 0.05$  vs. I/R-treated mice.

Figure 8. Diagram showing different pathways of NF- $\kappa$ B signaling induced by I/R. In the hepatocyte, NF- $\kappa$ B controls protective genes after ischemia through a ROS-sensitive Src-mediated mechanism. However, high production of ROS by extended ischemia or by a deficient capacity to cope with oxidant production, as in GSH-depleted animals, reduces the transcription of NF- $\kappa$ B-responsive genes, and Src-mediated activation is ineffective. In contrast, Kupffer cells are mainly responsible for the production of NF- $\kappa$ B-dependent inflammatory proteins and show no evidence of reduction due to increased ROS production. In fact, levels of mRNAs from inflammatory genes rise as the time of ischemia was extended.

## REFERENCES

1. Luedde T, Trautwein C: Intracellular survival pathways in the liver. *Liver Int* 2006, 26:1163-1174
2. Schwabe RF, Brenner DA: Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006, 290:G583-589
3. Kuboki S, Okaya T, Schuster R, Blanchard J, Denenberg A, Wong HR, Lentsch AB: Hepatocyte NF-kappaB activation is hepatoprotective during ischemia-reperfusion injury and is augmented by ischemic hypothermia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007, 292:G201-207
4. Suetsugu H, Iimuro Y, Uehara T, Nishio T, Harada N, Yoshida M, Hatano E, Son G, Fujimoto J, Yamaoka Y: Nuclear factor {kappa}B inactivation in the rat liver ameliorates short term total warm ischaemia/reperfusion injury. *Gut* 2005, 54:835-842
5. Luedde T, Assmus U, Wüstefeld T, Meyer zu Vilsendorf A, Roskams T, Schmidt-Supprian M, Rajewsky K, Brenner DA, Manns MP, Pasparakis M, Trautwein C: Deletion of IKK2 in hepatocytes does not sensitize these cells to TNF-induced apoptosis but protects from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2005, 115:849-859
6. Beraza N, Lüdde T, Assmus U, Roskams T, Vander Borgh S, Trautwein C: Hepatocyte-specific IKK gamma/NEMO expression determines the degree of liver injury. *Gastroenterology* 2007, 132:2504-2517
7. Urakami H, Abe Y, Grisham MB: Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in partial liver transplantation: lessons learned from reduced-size liver ischaemia and reperfusion injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007, 34:912-919
8. Teoh N, Field J, Sutton J, Farrell G: Dual role of tumor necrosis factor-alpha in hepatic ischemia-reperfusion injury: studies in tumor necrosis factor-alpha gene knockout mice. *Hepatology* 2004, 39:412-421



9. Tsung A, Hoffman RA, Izuishi K, Critchlow ND, Nakao A, Chan MH, Lotze MT, Geller DA, Billiar TR: Hepatic ischemia/reperfusion injury involves functional TLR4 signaling in nonparenchymal cells. *J Immunol* 2005, 175:7661-7668
10. Hayden MS, Ghosh S: Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 2008, 132:344-362
11. Kawai T, Akira S: Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 2007, 13:460-469
12. Zhai Y, Qiao B, Shen XD, Gao F, Busuttill RW, Cheng G, Platt JL, Volk HD, Kupiec-Weglinski JW: Evidence for the pivotal role of endogenous toll-like receptor 4 ligands in liver ischemia and reperfusion injury. *Transplantation* 2008, 85:1016-1022
13. Tsung A, Klune JR, Zhang X, Jeyabalan G, Cao Z, Peng X, Stolz DB, Geller DA, Rosengart MR, Billiar TR: HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor 4 dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated signaling. *J Exp Med* 2007, 204:2913-2923
14. Fan C, Li Q, Zhang Y, Liu X, Luo M, Abbott D, Zhou W, Engelhardt JF: IkappaBalpha and IkappaBbeta possess injury context-specific functions that uniquely influence hepatic NF-kappaB induction and inflammation. *J Clin Invest* 2004, 113:746-755
15. Koong AC, Chen EY, Giaccia AJ: Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer Res* 1994, 54:1425-1430
16. Imbert V, Rupec RA, Livolsi A, Pahl HL, Traenckner EB, Mueller-Dieckmann C, Farahifar D, Rossi B, Auberger P, Baeuerle PA, Peyron JF: Tyrosine phosphorylation of I kappa B-alpha activates NF-kappa B without proteolytic degradation of I kappa B-alpha. *Cell* 1996, 86:787-798
17. Takada Y, Mukhopadhyay A, Kundu GC, Mahabeleshwar GH, Singh S, Aggarwal BB: Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I

kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2003, 278:24233-24241

18. Fan C, Li Q, Ross D, Engelhardt JF: Tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha activates NF kappa B through a redox-regulated and c-Src-dependent mechanism following hypoxia/reoxygenation. *J Biol Chem* 2003, 278:2072-2080.

19. Lluís JM, Buricchi F, Chiarugi P, Morales A, Fernández-Checa JC: Dual role of mitochondrial reactive oxygen species in hypoxia signaling: activation of nuclear factor- $\{\kappa\}$ B via c-SRC and oxidant-dependent cell death. *Cancer Res* 2007, 67:7368-7377

20. Sato H, Sato M, Kanai H, Uchiyama T, Iso T, Ohyama Y, Sakamoto H, Tamura J, Nagai R, Kurabayashi M: Mitochondrial reactive oxygen species and c-Src play a critical role in hypoxic response in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2005, 67:714-722

21. Lou H, Kaplowitz N: Glutathione depletion down-regulates tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activity via IkappaB kinase-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 2007, 282:29470-29481

22. Dröge W, Schulze-Osthoff K, Mihm S, Galter D, Schenk H, Eck HP, Roth S, Gmünder H: Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J* 1994, 8:1131-1138

23. Marí M, Colell A, Morales A, Pañeda C, Varela-Nieto I, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC: Acidic sphingomyelinase downregulates the liver-specific methionine adenosyltransferase 1A, contributing to tumor necrosis factor-induced lethal hepatitis. *J Clin Invest* 2004, 113:895-904

24. Lu SC, Alvarez L, Huang ZZ, Chen L, An W, Corrales FJ, Avila MA, Kanel G, Mato JM: Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:5560-5565

25. García-Ruiz C, Morales A, Colell A, Ballesta A, Rodés J, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC: Feeding S-adenosyl-L-methionine attenuates both ethanol-induced depletion

of mitochondrial glutathione and mitochondrial dysfunction in periportal and perivenous rat hepatocytes. *Hepatology* 1995, 21:207-214

26. Jeon BR, Lee SM: S-adenosylmethionine protects post-ischemic mitochondrial injury in rat liver. *J Hepatol* 2001, 34:395-401

27. Llacuna L, Marí M, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC, Morales A: Critical role of acidic sphingomyelinase in murine hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 2006, 44:561-572

28. Bailey SM, Reinke LA: Antioxidants and gadolinium chloride attenuate hepatic parenchymal and endothelial cell injury induced by low flow ischemia and reperfusion in perfused rat livers. *Free Radic Res* 2000, 32:497-506

29. Jang JH, Moritz W, Graf R, Clavien PA: Preconditioning with death ligands FasL and TNF-alpha protects the cirrhotic mouse liver against ischaemic injury. *Gut* 2008, 57:492-499

30. Smedsrod B, Pertoft H, Eggertsen G, Sundstrom C: Functional and morphological characterization of cultures of Kupffer cells and liver endothelial cells prepared by means of density separation in Percoll, and selective substrate adherence. *Cell Tissue Res* 1985, 241:639-49.

31. Marí M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballeria J, Fernandez A, Enrich C, Fernandez-Checa JC, García-Ruiz C: Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab* 2006, 4:185-198

32. Finkelstein JD: Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin Chem Lab Med* 2007, 45:1694-1699

33. Shimizu-Saito K, Horikawa S, Kojima N, Shiga J, Senoo H, Tsukada K: Differential expression of S-adenosylmethionine synthetase isozymes in different cell types of rat liver. *Hepatology* 1997, 26:424-431.

34. Wu TJ, Khoo NH, Zhou F, Day BJ, Parks DA: Decreased hepatic ischemia-reperfusion injury by manganese-porphyrin complexes. *Free Radic Res* 2007, 41:127-134

35. Shen XD, Ke B, Zhai Y, Gao F, Tsuchihashi S, Lassman CR, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW: Absence of toll-like receptor 4 (TLR4) signaling in the donor organ reduces ischemia and reperfusion injury in a murine liver transplantation model. *Liver Transpl* 2007, 13:1435-1443
36. Rüdiger HA, Graf R, Clavien PA: Sub-lethal oxidative stress triggers the protective effects of ischemic preconditioning in the mouse liver. *J Hepatol* 2003, 39:972-977
37. Rehman H, Connor HD, Ramshesh VK, Theruvath TP, Mason RP, Wright GL, Lemasters JJ, Zhong Z: Ischemic Preconditioning Prevents Free Radical Production and Mitochondrial Depolarization in Small-for-Size Rat Liver Grafts. *Transplantation* 2008, 85:1322-1331
38. Saba H, Batinic-Haberle I, Munusamy S, Mitchell T, Lichti C, Megyesi J, MacMillan-Crow LA: Manganese porphyrin reduces renal injury and mitochondrial damage during ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2007, 42:1571-1578
39. Kim GW, Kondo T, Noshita N, Chan PH: Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals. *Stroke* 2002, 33:809-915
40. Chen Z, Siu B, Ho YS, Vincent R, Chua CC, Hamdy RC, Chua BH: Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 1998, 30:2281-2289
41. Szeto HH: Mitochondria-targeted cytoprotective peptides for ischemia-reperfusion injury. *Antiox Redox Signal* 2008, 10:601-619.
42. Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N: Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005, 204:263-273
43. Ozaki M, Nakamura M, Teraoka S, Ota K: Ebselen, a novel anti-oxidant compound, protects the rat liver from ischemia-reperfusion injury. *Transpl Int* 1997, 10:96-102
44. Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, Meissner H, Michl P, Leiderer R, Schildberg FW, Messmer K, Bilzer M: Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia. *Ann Surg* 2004, 239:220-231

45. Sener G, Tosun O, Sehirli AO, Kaçmaz A, Arbak S, Ersoy Y, Ayanoglu-Dülger G: Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sci* 2003, 72:2707-2718
46. Grattagliano I, Vendemiale G, Lauterburg BH: Reperfusion injury of the liver: role of mitochondria and protection by glutathione ester. *J Surg Res* 1999, 86:2-8
47. Natoli G, Sacconi S, Bosisio D, Marazzi I: Interactions of NF-kappaB with chromatin: the art of being at the right place at the right time. *Nat Immunol* 2005, 6:439-445
48. Guo Z, Boekhoudt GH, Boss JM: Role of the intronic enhancer in tumor necrosis factor-mediated induction of manganous superoxide dismutase. *J Biol Chem* 2003, 278:23570-23578
49. Takahashi Y, Ganster RW, Gambotto A, Shao L, Kaizu T, Wu T, Yagnik GP, Nakao A, Tsoulfas G, Ishikawa T, Okuda T, Geller DA, Murase N: Role of NF-kappaB on liver cold ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002, 283:G1175-1184

Fig. 1

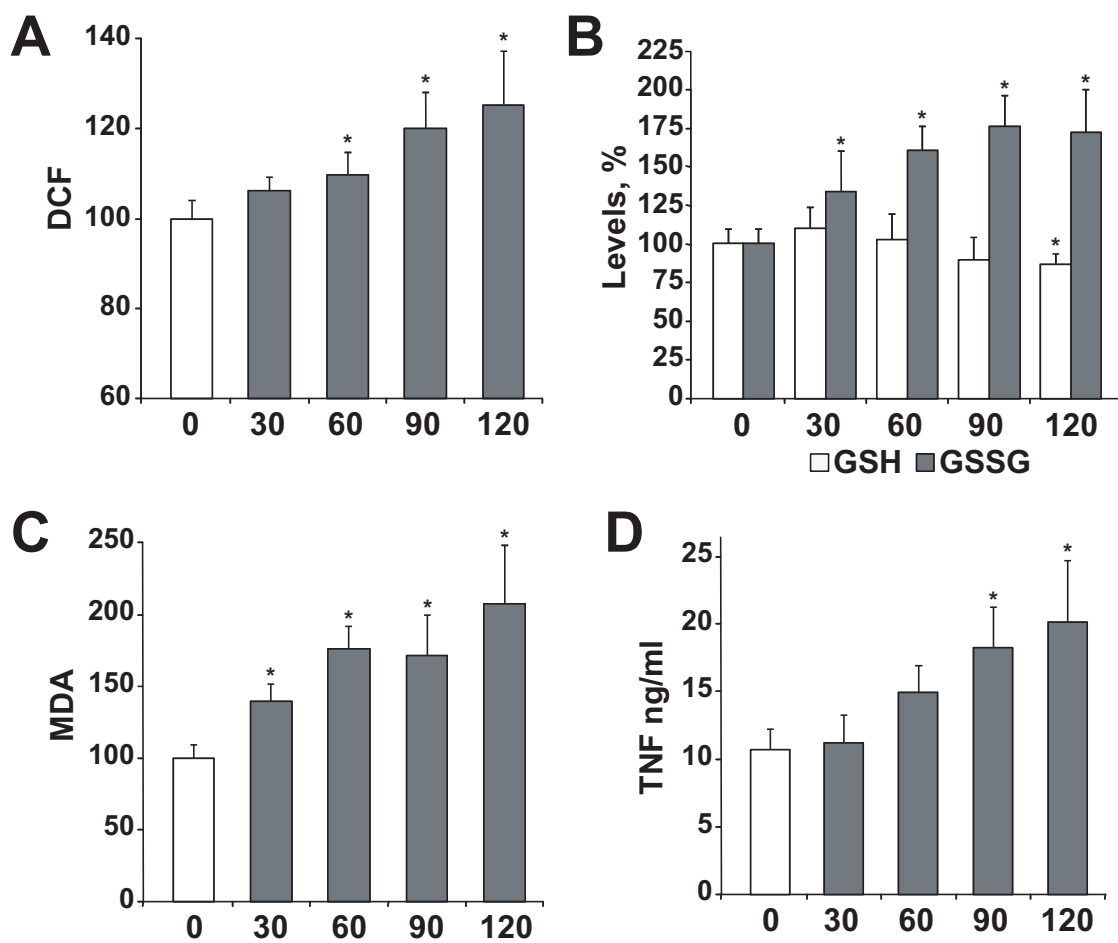


Fig. 2

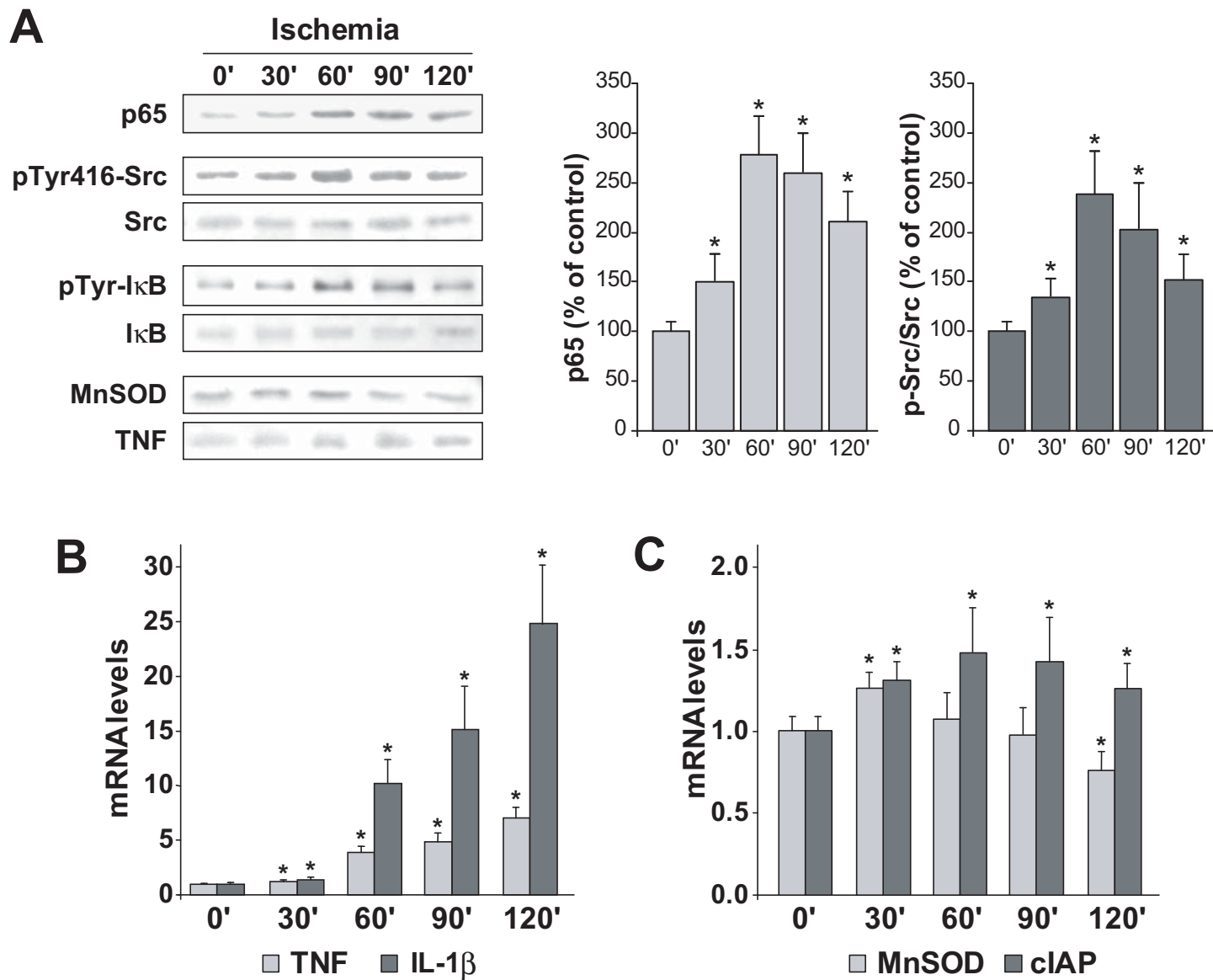


Fig. 3

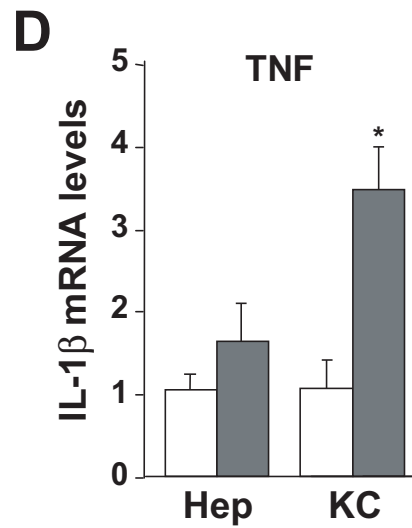
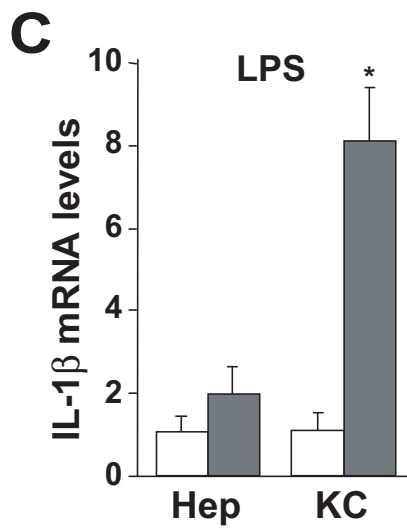
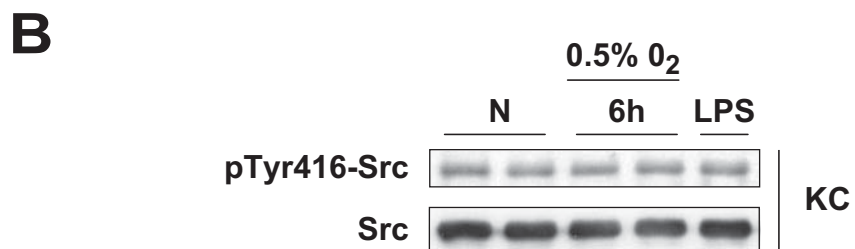
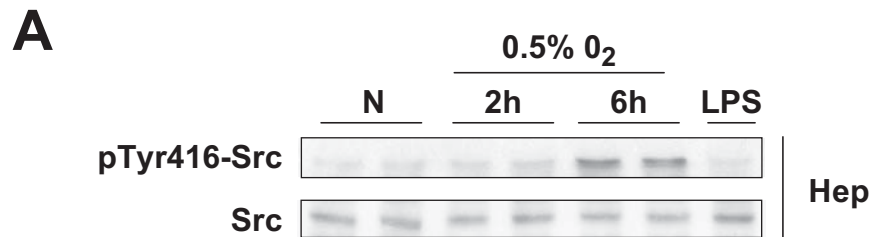
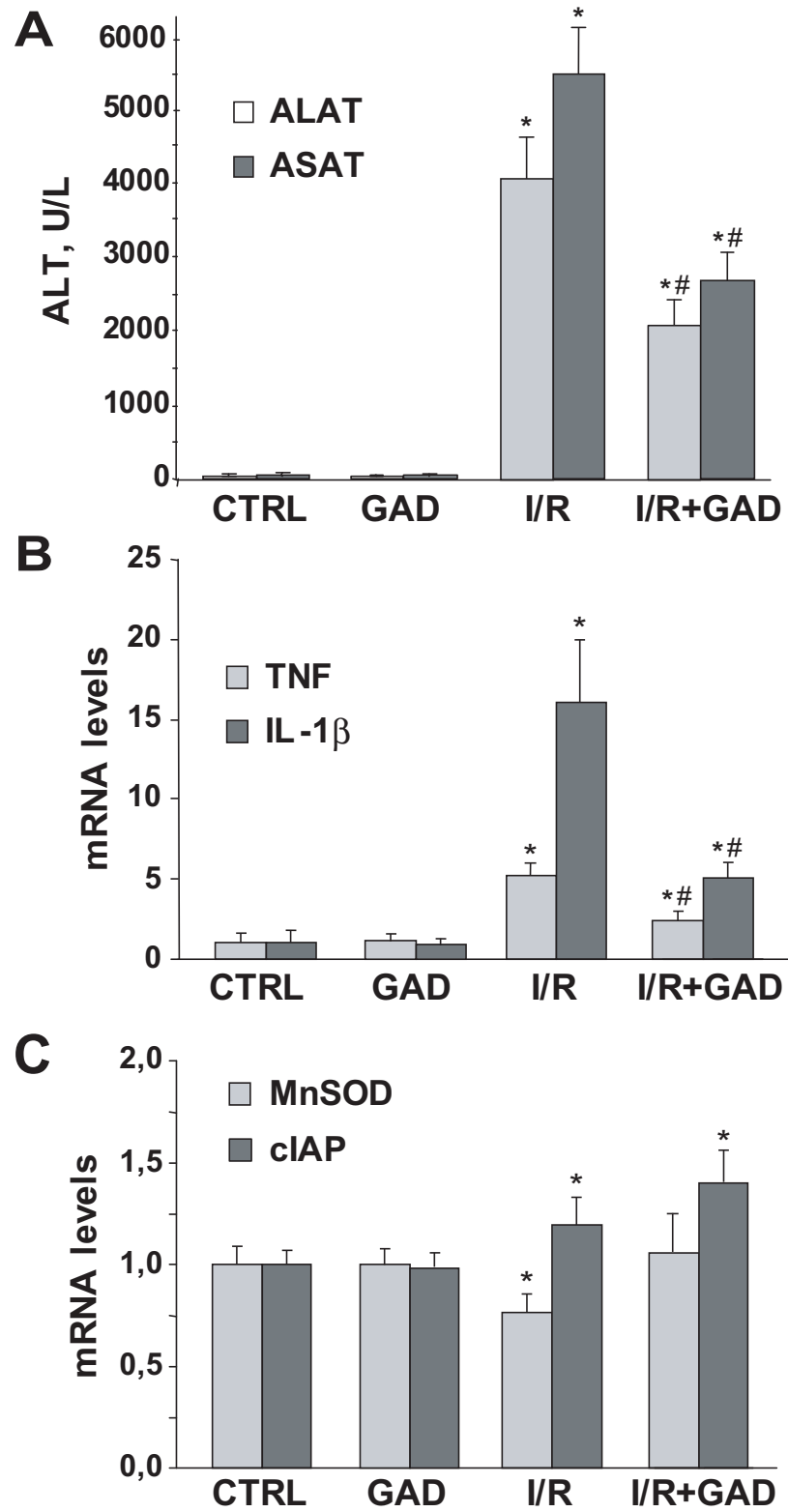




Fig. 4



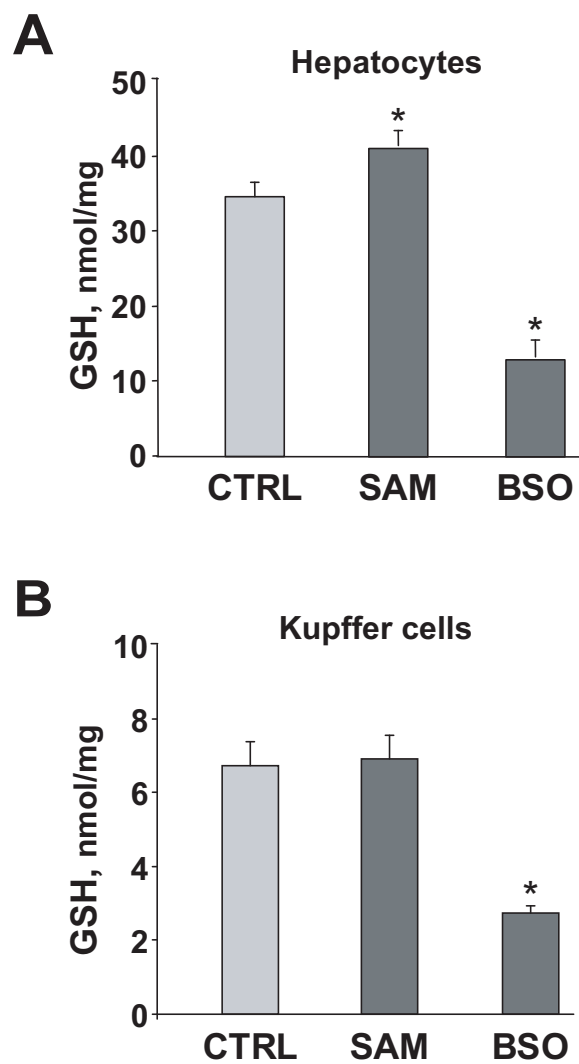


Fig. 6

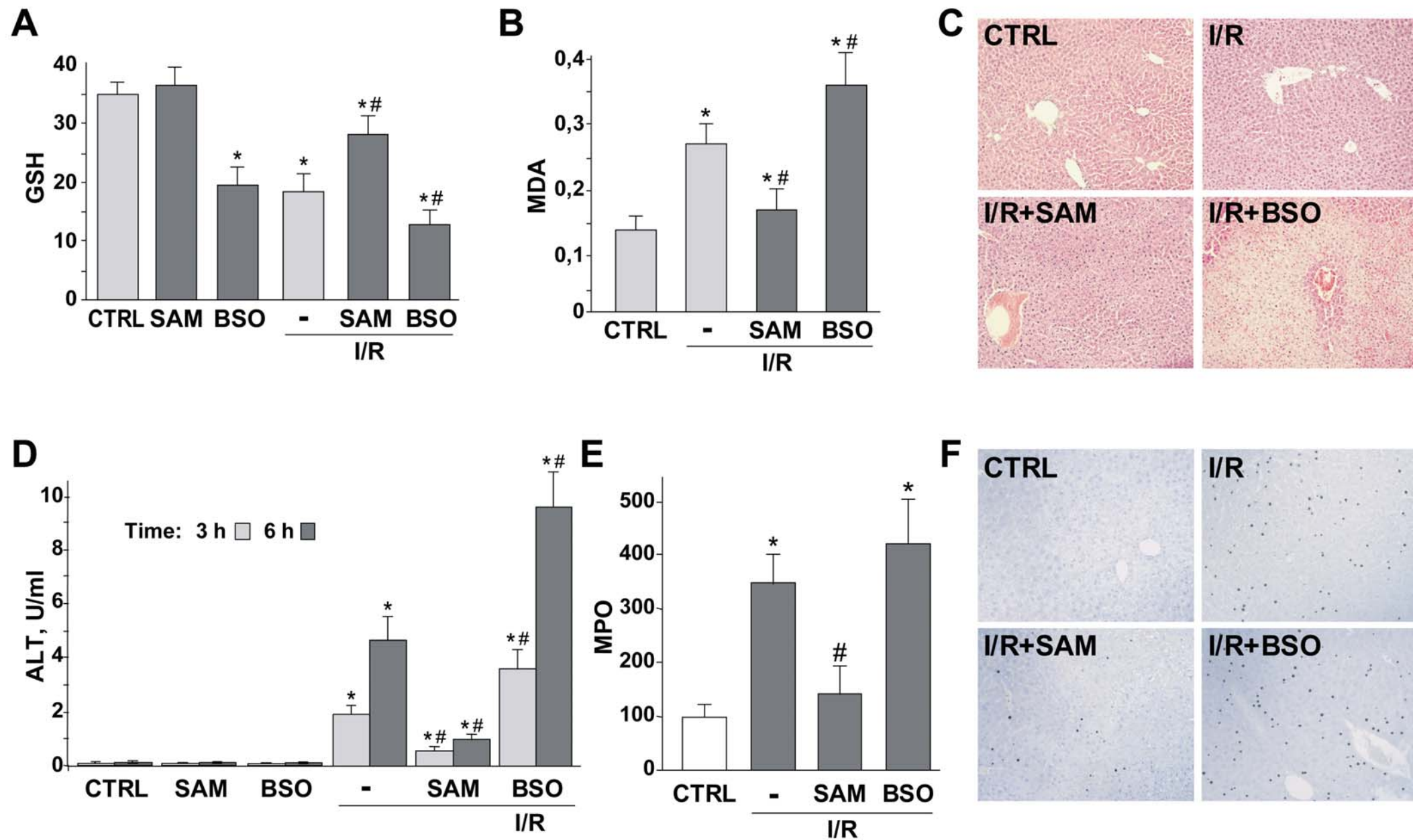


Fig. 7

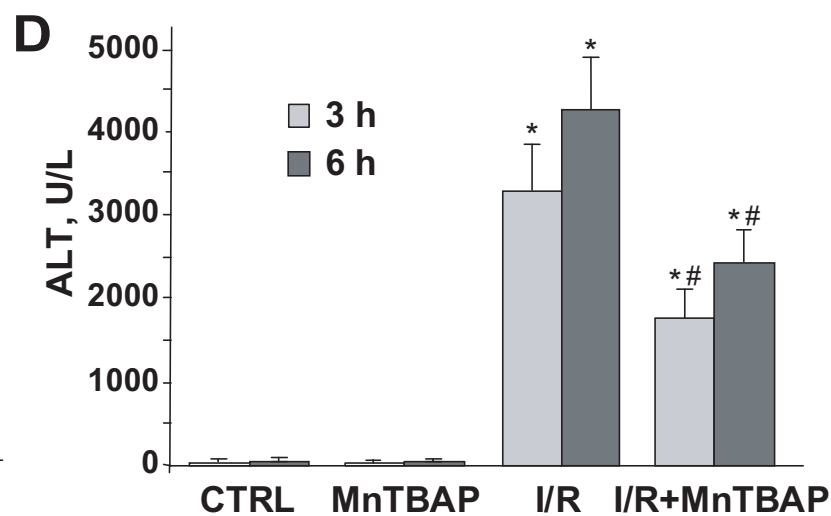
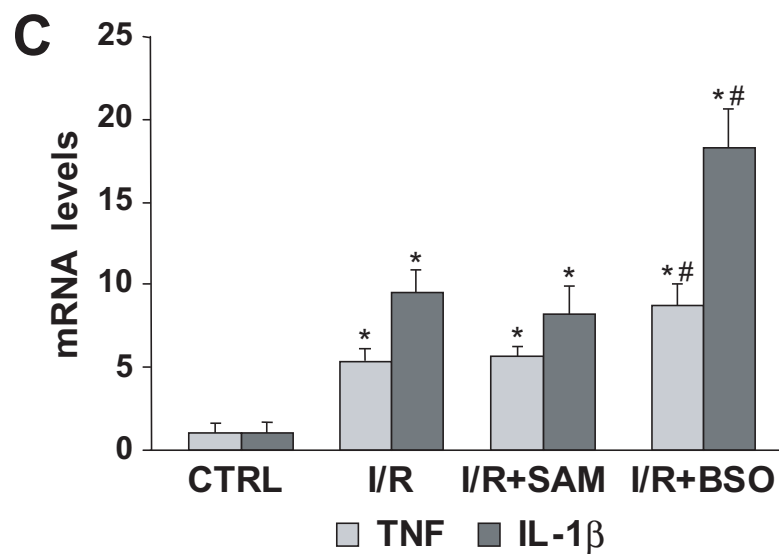
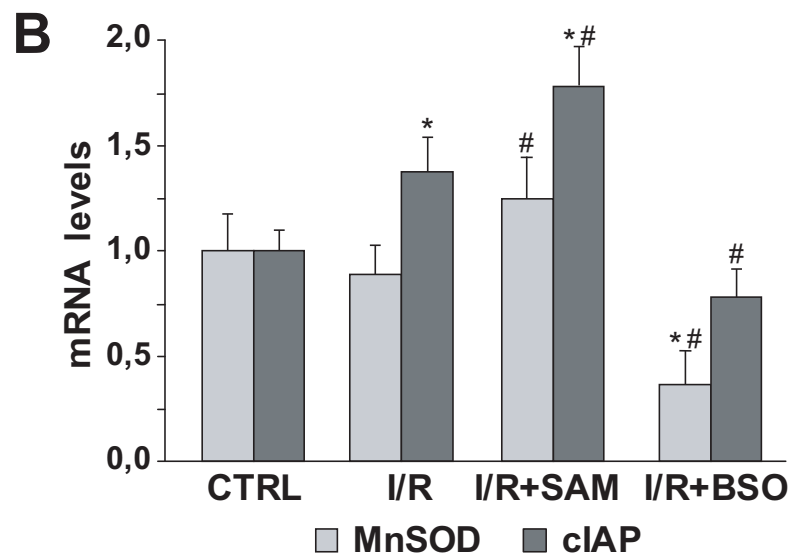
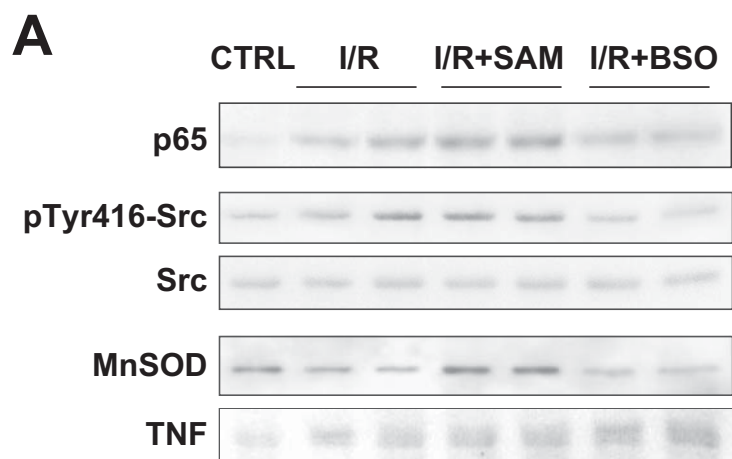
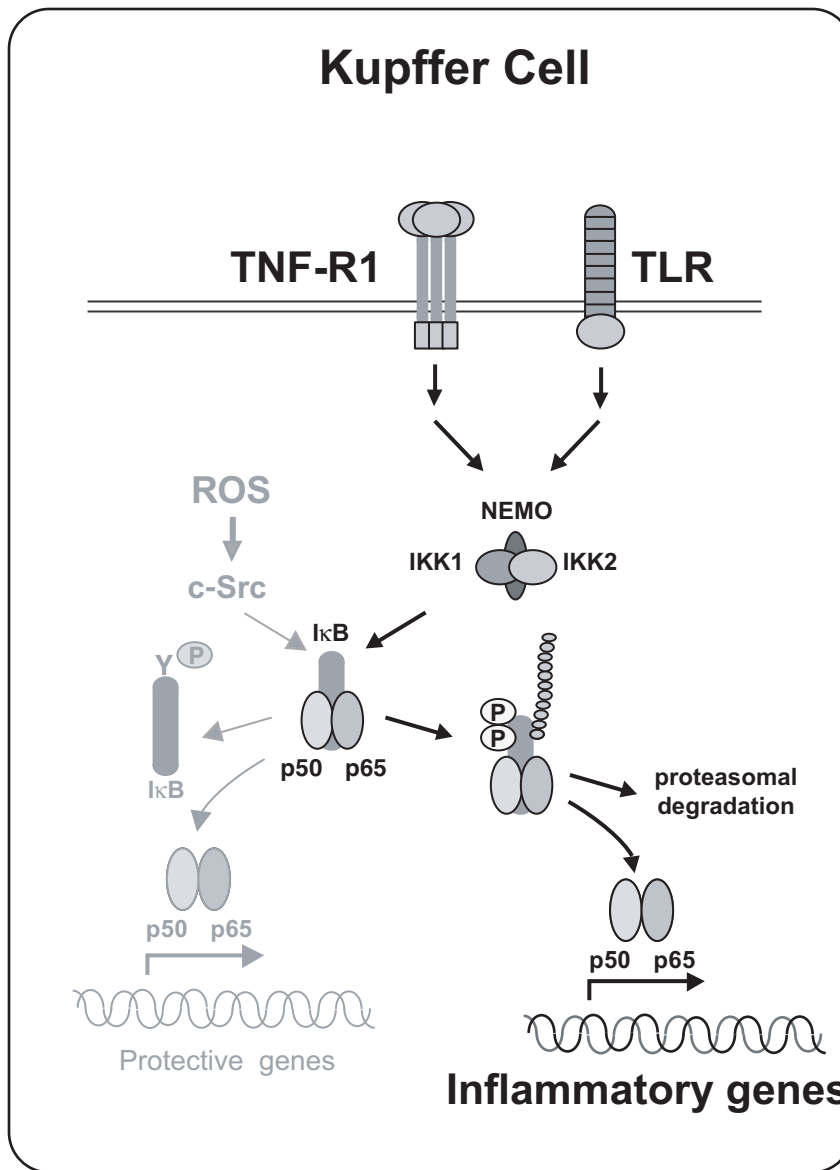
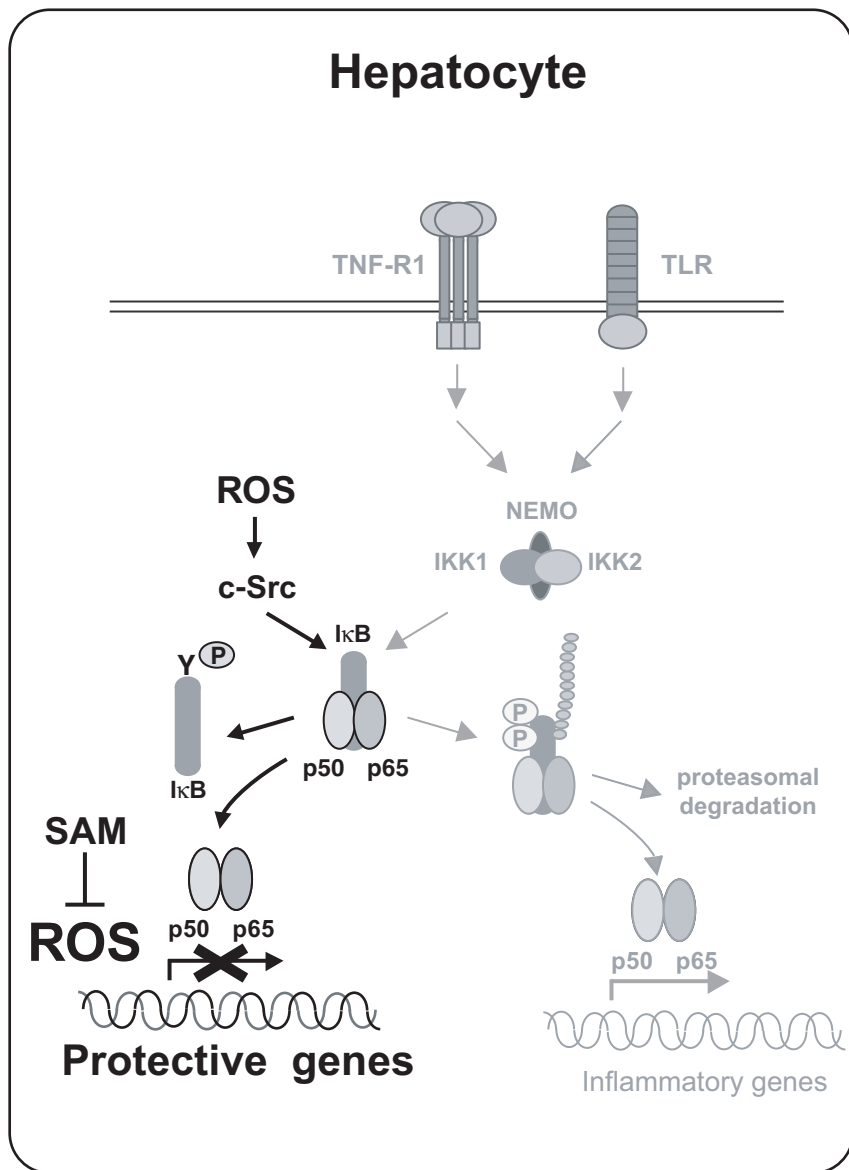
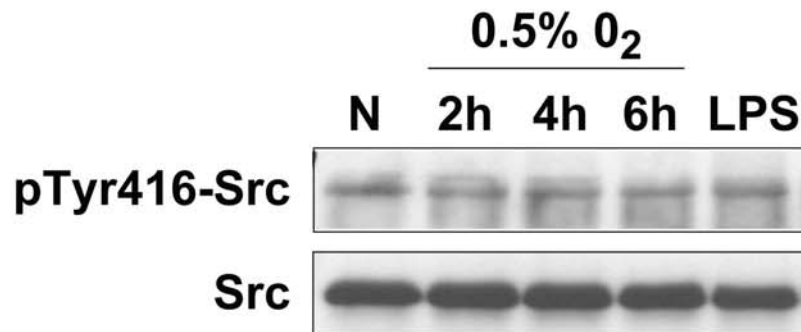


Fig. 8

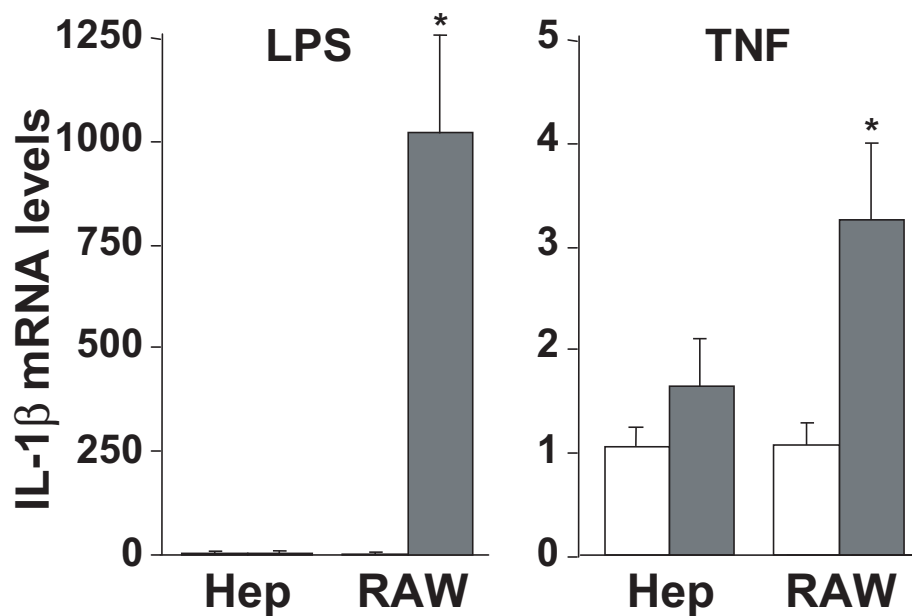


## Supplemental Fig. 1



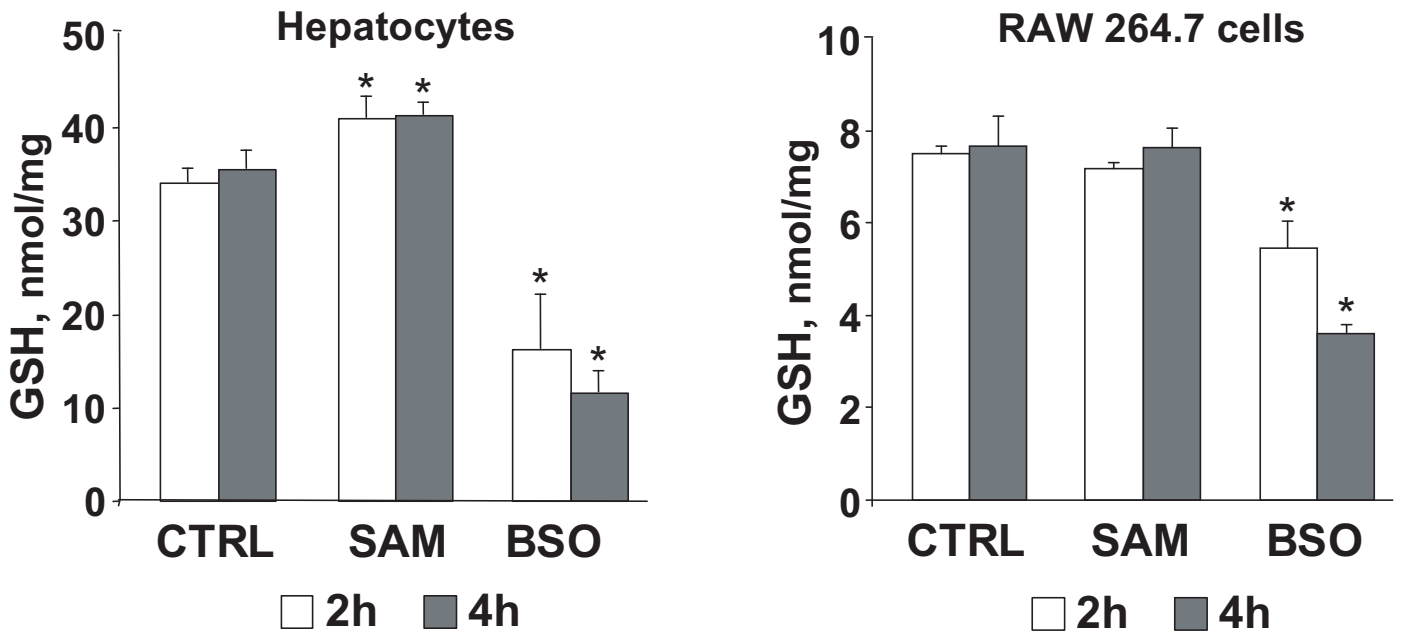
**Src phosphorylation did not increased in RAW 264.7 macrophages neither in hypoxic conditions (0.5% O<sub>2</sub>) nor after LPS exposure (2 h, 0.1 ng/ml). Representative western blot (n=2).**

## Supplemental Fig. 2



Levels of IL-1 $\beta$  mRNA in Raw 246.4 macrophages after LPS (4 h, 0.1 ng/ml) and TNF (4 h, 250 ng/ml) treatment (full bars) respect non-treated cells (empty bars), normalized by 18S mRNA levels. (n = 3) \*P < 0.05 vs. control cells.

## Supplemental Fig. 3



Variation of GSH levels at indicated times after SAM (2 mM) and BSO (1 mM) treatment in primary murine hepatocytes (C) and RAW 246.4 macrophages. (n = 3) \*P < 0.05 vs. control cells.