

XXXI CONGRESO NACIONAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA PARA EL ESTUDIO DEL HÍGADO

Contribución de la ciclooxygenasa 2 a las afecciones del hígado: inhibición de la apoptosis en las células hepáticas

A. Fernández-Martínez^a, R. Mayoral Moñibas^a, R. Roy Barcelona^a y P. Martín-Sanz^{a,b}

^aCentro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). Madrid. España.

^bCentro de Investigaciones Biológicas CIB (CSIC). Madrid.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas ciclooxygenasas (COX) catalizan el primer paso en la biosíntesis de las prostaglandinas (PG) y los tromboxanos. La isoforma COX-1 se expresa constitutivamente en varios tejidos, mientras que la COX-2 es inducible por factores de crecimiento, promotores tumorales y citoquinas. El papel de la COX-2 en la producción y el desarrollo de tumores preneoplásicos está bien establecido, especialmente en el cáncer de colon¹. Varios autores han descrito que el incremento en la expresión de COX-2 en tejidos y la producción de PG podría contribuir al desarrollo de otros cánceres, como el carcinoma hepatocelular (CHC)². La expresión de COX-2 se ha demostrado en varios contextos de la patología hepática: regeneración tras hepatectomía parcial³, modelos animales de cirrosis, células de hepatoma humanas, infección crónica por el virus de la hepatitis C⁴ y CHC. Uno de los mecanismos propuestos para explicar la contribución de COX-2 al desarrollo y la progresión tumoral es la inhibición de la apoptosis (fig. 1).

La apoptosis está mediada por la activación de las caspasas, una familia de las cisteína proteasas⁵. La activación de caspasas tiene lugar por al menos dos mecanismos bien conocidos: la vía extrínseca o de receptores de muerte, iniciada por agonistas de la superfamilia del factor de necrosis tumoral como TNF α , FasL y Apo2 ligando/TRAIL, y la vía intrínseca o mitocondrial⁶. En la vía mitocondrial, la activación de caspasas se produce como resultado de la liberación del citocromo C de la mitocondria, un proceso regulado por la familia de proteínas de

Bcl-2. En el hígado, las vías intrínseca y extrínseca son operativas. El hígado humano y el de ratón expresan constitutivamente Fas, y esta vía parece tener gran relevancia en los procesos apoptóticos en hepatocitos sanos y en la patogenia de enfermedades como la hepatitis viral y la cirrosis⁷. En cambio, el CHC es uno de los tumores resistentes a la apoptosis mediada por Fas.

Hemos utilizado dos aproximaciones para expresar COX-2 en células hepáticas y estudiar los mecanismos implicados en la inhibición de la apoptosis dependiente de COX-2. En primer lugar, generamos líneas celulares hepáticas que expresan COX-2 mediante transfección estable con un vector que contiene el ADNc de la COX-2 humana. Para el estudio *in vivo* hemos usado un sistema de transfección hidrodinámica para administrar a los ratones el plásmido pcDNA3hCOX-2-GFP. Nuestros resultados muestran que tanto *in vitro* como *in vivo* la expresión de COX-2 inhibe directamente la apoptosis en hepatocitos mediante mecanismos que implican la inhibición de las caspasas 3 y 9, una disminución de la expresión de p53 y Bax, y un incremento de las vías de supervivencia mediante la activación de Akt.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos

Los reactivos de electroforesis fueron de Bio-Rad (Hercules, Estados Unidos); anticuerpos de Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, Estados Unidos), BD Biosciences (San José, Estados Unidos), R & D Systems Inc. (Minneapolis, Estados Unidos) y Cell Signaling Technology (Beverly, Estados Unidos); sustratos fluorescentes de Calbiochem (La Jolla, Estados Unidos), y medios de cultivo El meE de BioWhittaker (Walkersville, Estados Unidos).

Cultivo celular y transfección estable

La línea celular humana CCL-13 (Chang liver, CHL) hepática no tumoral⁸ fue adquirida en la ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Estados Unidos) y cultivada según sus indicaciones. Para las transfecciones, se utilizó Fugene 6. Las células CHL fueron transfec-

A. Fernández-Martínez y R. Mayoral Moñibas disfrutan de una beca CNIC-BANCAJA. El trabajo ha sido financiado con los proyectos SAF2004-00957 y CAM2004-GR/SAL/0388.

Correspondencia: Dra. P. Martín Sanz.
Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, CNIC.
Melchor Fernández Almagro, 3. 28029 Madrid. España.
Correo electrónico: pmartin@cnic.es

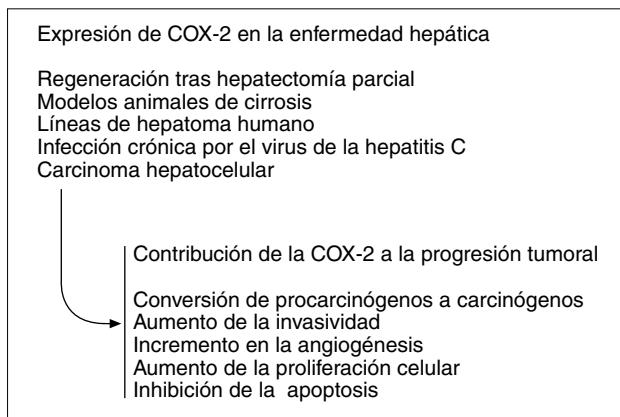


Fig. 1. Implicación de la ciclooxigenasa 2 en la enfermedad hepática.

das y seleccionadas en medio suplementado con 500 µg/ml de G418 (geneticina). Se detectaron colonias resistentes al antibiótico, que se aislaron y subcultivaron. Las células con expresión estable de los vectores pcDNA3hCOX-2 y pcDNA3 se denominaron CHL-C y CHL-V, respectivamente (fig. 2).

Caracterización de los vectores

Los vectores pcDNA3 y pEGFP-N1 fueron adquiridos de Invitrogen y BD Biosciences (Clontech), respectivamente. El ADNC de COX-2 *full-length* fue donado amablemente por S. Prescott (Huntsman Cancer Institute, Utah, Estados Unidos) y posteriormente fue clonado en el vector de expresión pcDNA3. La proteína de fusión COX-2-GFP se obtuvo como está descrito¹⁰.

Distribución del ciclo celular

Se resuspendieron las células en PBS, y se las fijó en etanol al 70%. Posteriormente se las incubó con 0,05% de yoduro de propidio (IP) y 0,1 mg/ml ARNasa durante 30 min para analizarlas en un citómetro CyAn MLE-R (DakoCytomation).

Análisis de cortes histológicos de hígado

Los tejidos fueron crioprotectados y congelados. Los cortes seriados de 10 µm se fijaron, bloquearon y trataron con anticuerpo GFP (1:50; Molecular Probes) en suero de caballo al 5% a 4 °C. Tras 3 lavados con PBS, las secciones se incubaron a una dilución 1:500 del anticuerpo secundario fluorescente (IgG-Alexa Fluor 488), se lavaron, y la fluorescencia se visualizó y cuantificó con un microscopio Radiance 2100 (Bio-Rad) y software Lasersharp. Para la detección y cuantificación de la apoptosis se usaron reactivos comerciales para TUNEL (Roche).

Ensayo de la actividad caspasa *in vitro*

Los extractos de tejido se prepararon en tampón de 10 mmol de HEPES a pH 7,9; 1 mmol de EGTA, 1 mmol de EDTA, 120 mmol de ClNa, inhibidores de proteasas y un 0,5% de Nonidet P-40 frío. Los sustratos utilizados para determinar la actividad de la caspasa 3 y la caspasa 9 fueron N-acetil-DEVD-AMC y N-acetil-LEHD-AFC respectivamente.

Extractos celulares y Western blot

Las células (2-3 × 10⁶) o muestras de tejido (100 mg) fueron homogeneizadas en tampón de lisis: 10 mmol de Tris-ClH a pH 7,5; 1 mmol de Cl₂Mg; 1 mmol de EGTA; un 10% de glicerol; 0,1 mmol PMSF, y un 0,5% de CHAPS. Los extractos se agitaron durante 30 min y se centrifugaron a 13.000 g¹¹. Para determinar la liberación de citocromo C al citosol desde la mitocondria, se obtuvieron extractos celulares según se había descrito previamente¹². Se fraccionaron electroforeticamente cantidades iguales de proteína en un gel SDS poliacrilamida al 10%, en

condiciones desnaturizantes. A continuación se transfirieron a membranas HybondTM-PVDF (Amersham). Las cantidades relativas de Bax, p53, citocromo C y Akt/P-Akt (S473) se determinaron en el extracto proteico adecuado, con los correspondientes anticuerpos. Las membranas fueron reveladas por el protocolo de ECL (Amersham). Las membranas se expusieron a películas autoradiográficas (Hyperfilm-MP, Amersham). La cuantificación se realizó por densitometría y se expresó en unidades arbitrarias.

Transfección hidrodinámica en ratón

Los plásmidos (100 µg en 2 ml de ClNa al 0,9%) se inyectaron en la vena de la cola de ratones adultos machos Swiss CD1 (Charles River) de 18-22 g¹³. Se utilizaron 5 animales para cada condición, y tras 24 h fueron tratados intraperitonealmente con una única dosis de anticuerpo monoclonal anti-FAS, Jo2 (0,3 µg/g peso) disuelto en ClNa al 0,9%. Los animales fueron sacrificados 5 h después y los hígados fueron congelados en N₂ líquido.

Métodos estadísticos

Los valores presentados son la media ± la desviación estándar (DE). La significación estadística de las diferencias se evaluó mediante el análisis de Mann-Whitney. El nivel de significación se define como p < 0,05.

RESULTADOS

La expresión de COX-2 en células hepáticas inhibe la apoptosis

El análisis del ciclo celular por tinción con IP y FACS reveló que la expresión de COX-2 se asocia con una marcada inhibición de la apoptosis en CHL-C tras 72 h de cultivo en ausencia de suero (fig. 3A). Tras 72 h de cultivo, sólo un 4% de las células CHL-C fueron apoptóticas, comparado con un 11% de las células CHL-V (fig. 3B). Además, las células CHL-C fueron resistentes a la inducción de apoptosis por estaurosporina o camptotecina, con una disminución de la apoptosis del 30% respecto a las

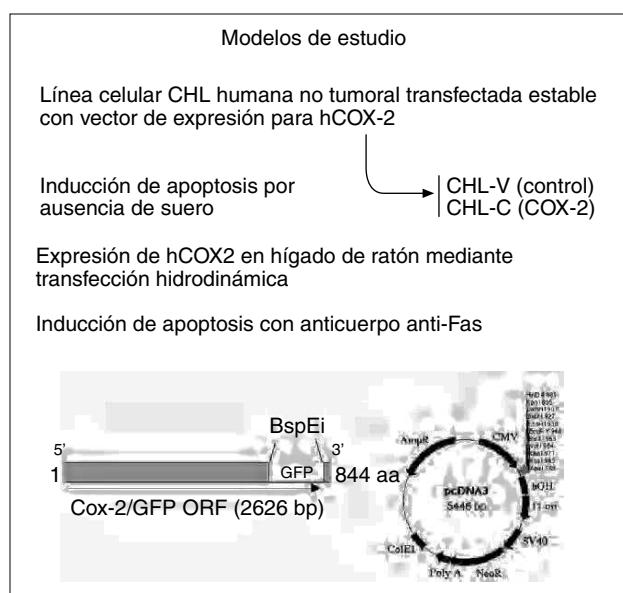


Fig. 2. Modelos para el estudio de la relación de la ciclooxigenasa 2 con el proceso de apoptosis.

CHL-V. Ambas líneas, en cambio, fueron resistentes a la inducción de apoptosis por anti-Fas (resultados no mostrados).

La COX-2 altera la expresión y la actividad de los marcadores de apoptosis

Para investigar los mecanismos por los que la COX-2 inhibe la apoptosis en el hígado, medimos en primer lugar la actividad de las caspasas 3 y 9 por análisis fluorimétrico. Como muestran las figuras 4A y B, la actividad de las caspasas 3 y 9 fue notablemente menor en las CHL-C que en las CHL-V. La figura 5 muestra el efecto de COX-2 en la expresión de varias proteínas relacionadas con el proceso apoptótico. La expresión de p53 disminuyó notablemente en las células CHL-C tras 6 h de ausencia de suero, mientras que en las CHL-V se mantuvo. Por el contrario, la expresión de Bax, ausente en ambas líneas al 10% de SBF, se observó en CHL-V desde las 6 h en ausencia de suero, pero no se detectó en CHL-C incluso tras 72 h sin suero. Además, el citocromo C apareció en el citosol solamente en CHL-V (figs. 5A y B). La PI3K/Akt es central en la integración de diversas vías de supervivencia. Los valores de fosfo-Akt (Ser473) se incrementaron en las células que expresan COX-2, lo que indica que participan en la supervivencia inducida por COX-2 (figs. 5C y D).

La expresión transitoria de COX-2 inhibe la apoptosis hepática *in vivo*

Para examinar si la expresión de COX-2 inhibía la apoptosis en células de hígado en el animal entero, desarrollamos un modelo *in vivo* para liberar el gen de la COX-2 en el hígado mediante un sistema de transfección hidrodinámica. La COX-2 se expresaba aproximadamente en un 35% de las células hepáticas de animales transfectados con una construcción GFP-COX-2, según se deduce de la fluorescencia observada (fig. 6A). La transfección con GFP-COX-2 en el hígado impidió la apoptosis inducida por Fas, como se demuestra de la inhibición de la actividad de caspasa 3 (fig. 6B) y la atenuación del marcaje en el análisis por TUNEL (fig. 6C).

DISCUSIÓN

El papel de COX-2 como inhibidor de las vías apoptóticas se ha demostrado en algunos modelos *in vivo* de ratones transgénicos. Los transgénicos que expresan COX-2 en la glándula mamaria desarrollan tumores, tienen cantidades reducidas de proteínas proapoptóticas Bax y Bcl-xL y aumentadas de Bcl-2¹⁴. En queratinocitos de lámina basal, los resultados son contradictorios, ya que se ha descrito hiperplasia de la epidermis por un lado y supresión del desarrollo de tumores por otro^{15,16}. Los ratones transgénicos con expresión de COX-2 en las neuronas desarro-

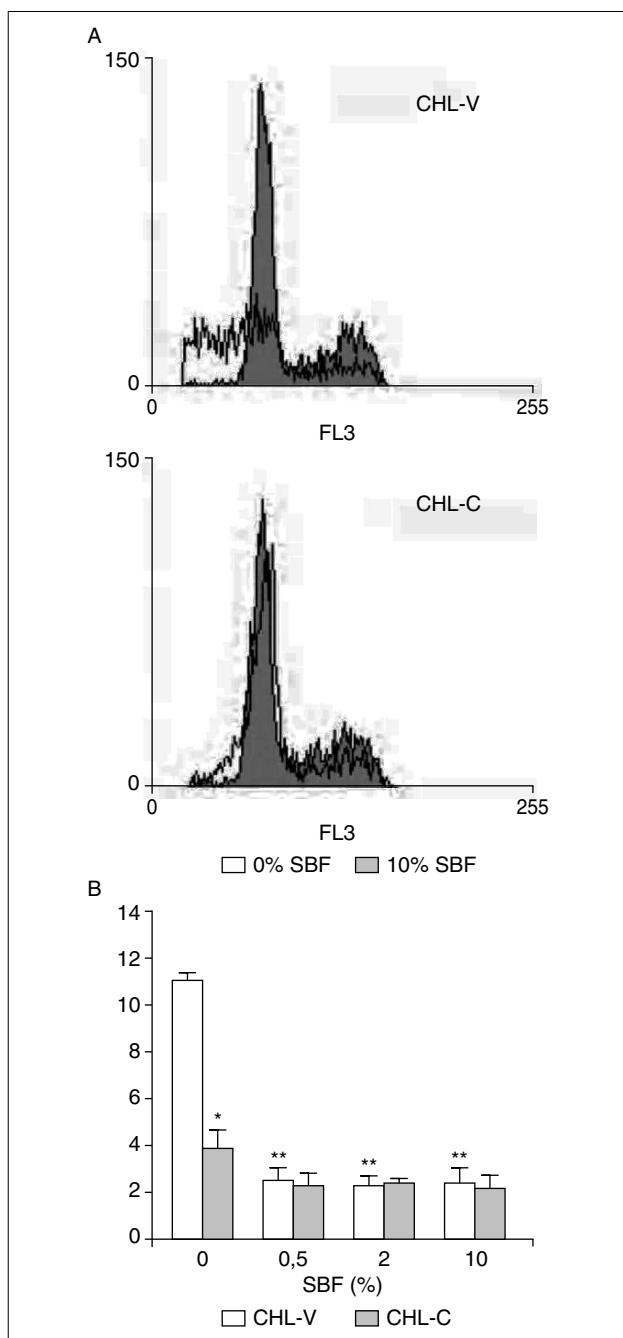


Fig. 3. La expresión de la ciclooxygenasa 2 inhibe la apoptosis en las células hepáticas. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo. (A) Histogramas representativos de tinción con IP en las células CHL-V y CHL-C tras 72 h al 0% y al 10% de SBF. (B) Efecto de la concentración de SBF en el porcentaje de células apoptóticas tras 72 h de cultivo. Todos los datos presentados son la media ± desviación estándar de 4 experimentos independientes. *p < 0,05 respecto a las células control CHL-V. **p < 0,05 respecto a las células al 0% SBF.

llaron deficiencias cognitivas con la edad debido a un incremento en la apoptosis neuronal¹⁷. Un estudio reciente demostró que se producían tumores de hiperplasia gástrica en ratones transgénicos con expresión de COX-2 y prostaglandina E sintetasa microsomal¹⁸.

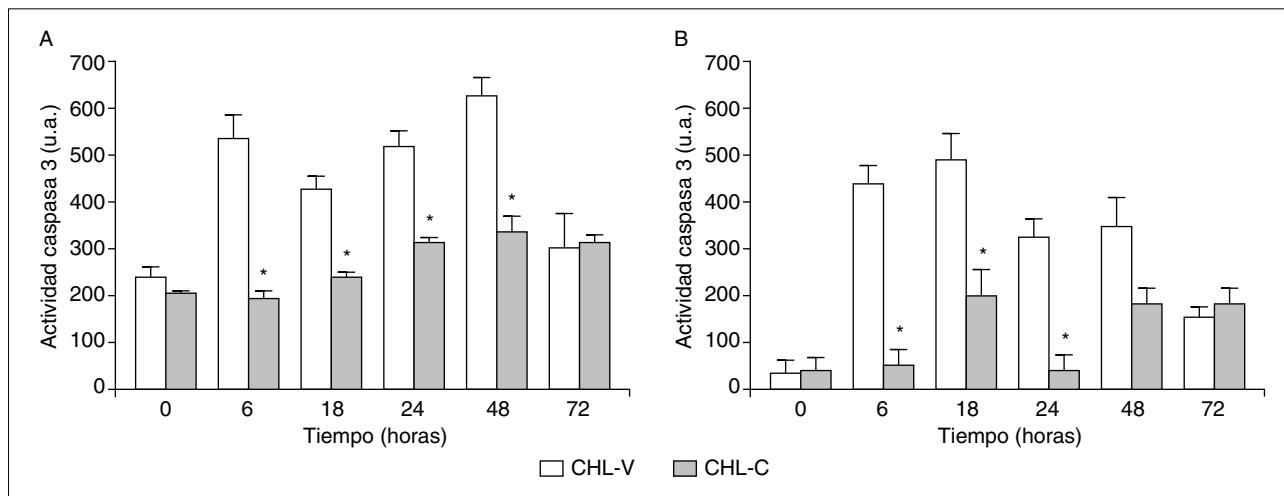


Fig. 4. La expresión de la ciclooxygenasa 2 suprime la actividad de las caspasas. Determinación de la actividad de caspasa 3 (A) y 9 (B) en células control CHL-V y con ciclooxygenasa 2 CHL-C, cultivadas en ausencia de SBF. Todos los datos presentados son la media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ respecto a las células control CHL-V.

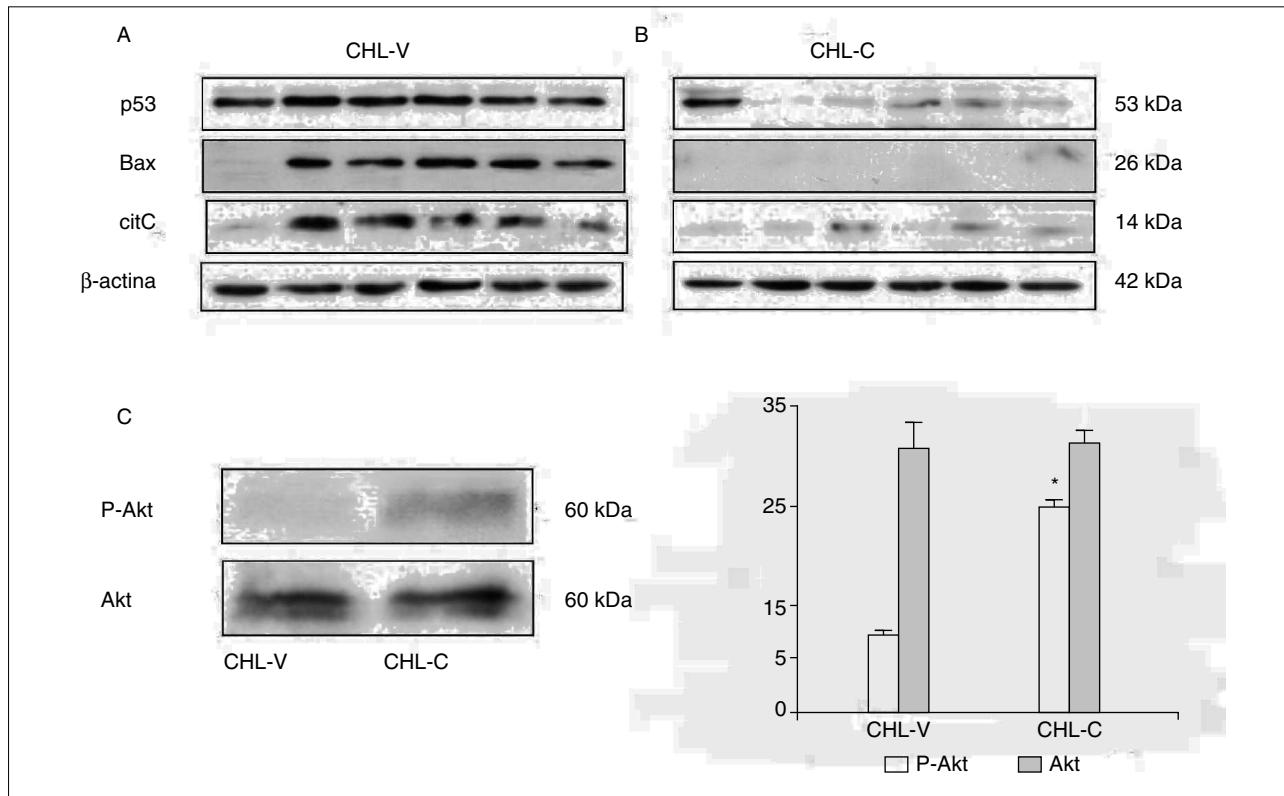


Fig. 5. Cambios en los indicadores de apoptosis en células con expresión estable de ciclooxygenasa 2. Western blot que muestra la expresión de p53 y Bax en las líneas CHL-V y CHL-C en ausencia de SBF y la liberación de citocromo C al citosol (A, B). Normalización con betaactina. Determinación de P-Akt (C, D). Los resultados muestran Wetern blot representativos y los datos son la media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ respecto a las células control CHL-V.

Aunque diversos estudios experimentales han demostrado *in vitro* una correlación clara entre la expresión de COX-2 y la inhibición de la apoptosis, aún no se comprende los mecanismos moleculares subyacentes. La mayor parte del trabajo se ha desarrollado en células de colon o de carcinoma

gástrico, donde se demostró que las células epiteliales de intestino de rata transfectadas establemente con COX-2 son resistentes a la apoptosis inducida por butirato¹⁹. Trabajos recientes han constatado un incremento en la expresión de COX-2 en el hígado de pacientes con CHC,

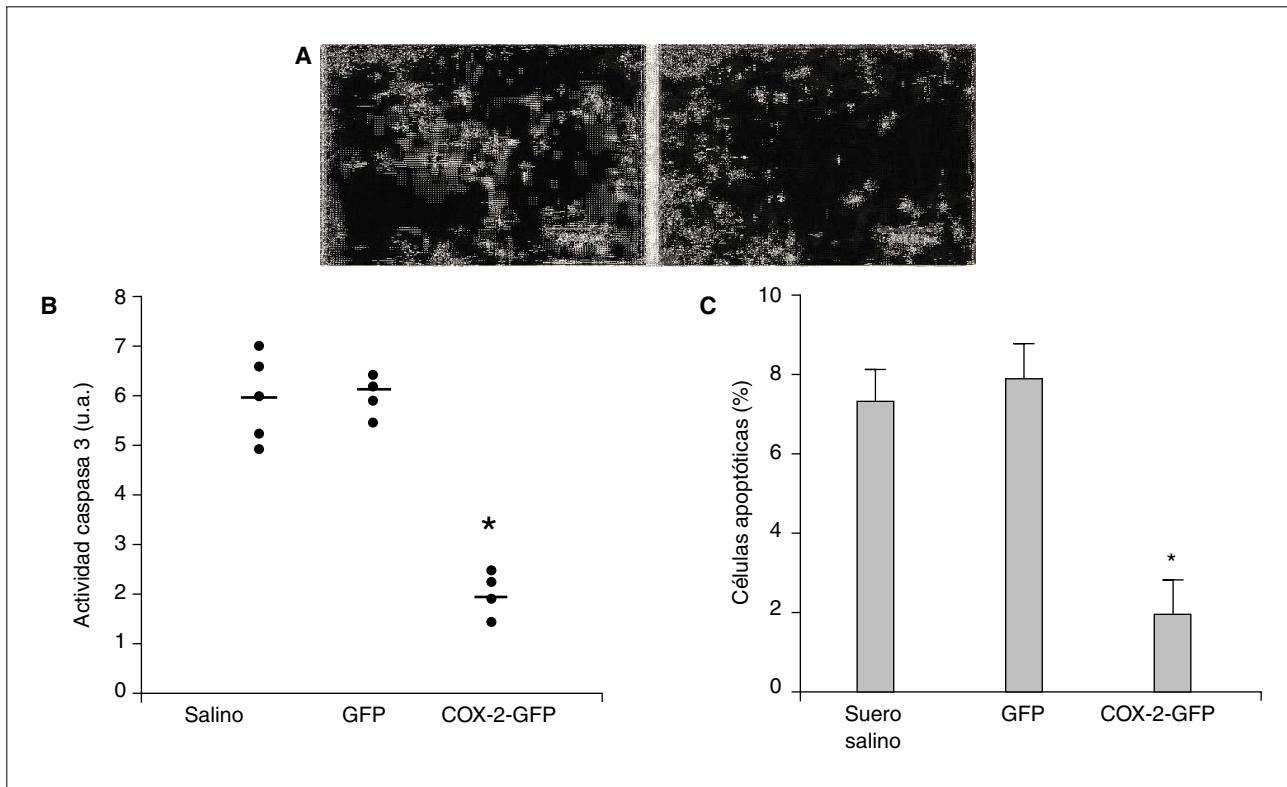


Fig. 6. La transfección hidrodinámica con GFP-COX-2 inhibe la apoptosis inducida por Fas en el hígado. Los ratones fueron transfectados con 100 µg de plásmido con el gen de GFP o GFP-COX-2. Los animales control fueron inyectados con suero salino. (A) Fluorescencia de GFP en secciones de hígado a 24 h tras la transfección hidrodinámica. (B) Medida de la actividad de caspasa 3 después del tratamiento con Jo2. (C) Cuantificación de la apoptosis por TUNEL en secciones de hígado tras la inyección de Jo2. Todos los resultados son la media ± desviación estándar de 5 animales por condición. **p* < 0,05 respecto a los animales transfectados con GFP.

especialmente en tejido cirrótico, así como en el tumor bien diferenciado²⁰. En CHC, la expresión de COX-2 parece estar aumentada en los estadios tempranos y disminuida en los estadios avanzados. Se han propuesto algunas vías de señalización como mediadores de la inhibición de la apoptosis dependiente de COX-2. La PGE₂ inhibe la apoptosis en las células de la mucosa gástrica mediante la vía mitocondrial y la activación de PKA²¹. Hay varios estudios que describen un efecto directo de la expresión de COX-2 en la apoptosis en el hígado o las células del CHC. Leng et al²² encontraron un incremento en la fosforilación de Akt en células Hep3B transfectadas transitoriamente con un vector de expresión de la COX-2. El inhibidor selectivo celecoxib disminuyó la activación de Akt e indujo la activación de caspasa 9 y 3 con la liberación del citocromo C. Nuestros resultados muestran una inhibición clara de las actividades de caspasa 3 y 9 en células que expresan COX-2. La ausencia del citocromo C en el citosol de las células CHL-C tras la exposición al estímulo proapoptótico implica claramente que las prostaglandinas producidas por COX-2 actúan en la vía mitocondrial impidiendo la apoptosis.

Se ha descrito que la COX-2 promueve la supervivencia de células del carcinoma de pulmón humano mediante la activación de la vía PI3K/Akt²³. Nuestros resultados de-

muestran que la PGE₂ producida por COX-2 induce un incremento significativo en la fosforilación de Akt, lo que indica la implicación de Akt en la supervivencia de las células del CHC dependiente de COX-2. La activación de la p53 es importante en la inducción de la apoptosis por varios estímulos. Una vez activada, la p53 regula negativamente la progresión del ciclo celular e induce apoptosis mediante la regulación del gen proapoptótico Bax en varias líneas celulares²⁴. En este sentido nuestros resultados muestran un descenso importante en los valores de p53 en las células CHL-C.

Los resultados obtenidos *in vivo* en ratones con transfección hidrodinámica de COX-2 demostraron claramente que las PG producidas por COX-2 protegen el hígado de la apoptosis mediada por Fas, de acuerdo con los resultados obtenidos *in vitro* en las líneas celulares.

En resumen, los resultados presentados en este estudio, indican que las PG producidas por COX-2 en el hígado, tanto *in vitro* como *in vivo*, inhiben la apoptosis. Dada la alta frecuencia de expresión de COX-2 en CHC, es de esperar que la COX-2 proporcione una ventaja a los carcinomas que la expresen. Este hallazgo podría explicar los efectos antiapoptóticos y hepatoprotectores de la PGE₂ tras el daño hepático agudo y la importante contribución de la COX-2 al desarrollo de tumores mediante un incremento en la resistencia a la apoptosis en CHC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kawai N, Tsuji M, Tsuji S. Cyclooxygenases and colon cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002;68-69:187-96.
2. Kondo M, Yamamoto H, Nagano H, et al. Increased expression of COX-2 in nontumor liver tissue is associated with shorter disease-free survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1999;5:4005-12.
3. Casado M, Callejas NA, Rodrigo J, et al. Contribution of cyclooxygenase 2 to liver regeneration after partial hepatectomy. *FASEB J.* 2001;15:2016-8.
4. Nunez O, Fernández-Martínez A, Majano PL, et al. Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. *Gut.* 2004;53:1665-72.
5. Talianian RV, Brady KD, Cryns VL. Caspases as targets for anti-inflammatory and anti-apoptotic drug discovery. *J Med Chem.* 2000;43:3351-71.
6. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998;281:1309-12.
7. Kondo T, Suda T, Fukuyama H, et al. Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. *Nat Med.* 1997;3:409-13.
8. Lee JS, Thorgeirsson SS. Functional and genomic implications of global gene expression profiles in cell lines from human hepatocellular cancer. *Hepatology.* 2002;35:1134-43.
9. Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, et al. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem.* 1993;268:9049-54.
10. Trifan OC, Smith RM, Thompson BD, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 induces cell cycle arrest. Evidence for a prostaglandin-independent mechanism. *J Biol Chem.* 1999;274: 34141-7.
11. Callejas NA, Bosca L, Williams CS, et al. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in hepatocytes by CCAAT-enhancer binding proteins. *Gastroenterology.* 2000;119:493-501.
12. Hortelano S, Zeini M, Castrillo A, et al. Induction of apoptosis by nitric oxide in macrophages is independent of apoptotic volume decrease. *Cell Death Differ.* 2002;9:643-50.
13. Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* 1999;6:1258-66.
14. Liu CH, Chang SH, Narko K, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem.* 2001;276:18563-9.
15. Neufang G, Furstenberger G, Heidt M, et al. Abnormal differentiation of epidermis in transgenic mice constitutively expressing cyclooxygenase-2 in skin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:7629-34.
16. Bol DK, Rowley RB, Ho CP, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression in the skin of transgenic mice results in suppression of tumor development. *Cancer Res.* 2002;62:2516-21.
17. Andreasson KI, Savonenko A, Vidensky S, et al. Age-dependent cognitive deficits and neuronal apoptosis in cyclooxygenase-2 transgenic mice. *J Neurosci.* 2001;21:8198-209.
18. Oshima H, Oshima M, Inaba K, et al. Hyperplastic gastric tumors induced by activated macrophages in COX-2/mPGES-1 transgenic mice. *EMBO J.* 2004;23:1669-78.
19. Tsuji M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell.* 1995;83:493-501.
20. Koga H. Hepatocellular carcinoma: is there a potential for chemoprevention using cyclooxygenase-2 inhibitors? *Cancer.* 2003;98:661-7.
21. Hoshino T, Tsutsumi S, Tomisato W, et al. Prostaglandin E2 protects gastric mucosal cells from apoptosis via EP2 and EP4 receptor activation. *J Biol Chem.* 2003;278:12752-8.
22. Leng J, Han C, Demetris AJ, et al. Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular carcinoma cell growth through Akt activation: evidence for Akt inhibition in celecoxib-induced apoptosis. *Hepatology.* 2003;38:756-68.
23. Lin MT, Lee RC, Yang PC, et al. Cyclooxygenase-2 inducing Mcl-1-dependent survival mechanism in human lung adenocarcinoma CL1.0 cells. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem.* 2001;276:48997-9002.
24. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997;88:323-31.