

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 transfecta-

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

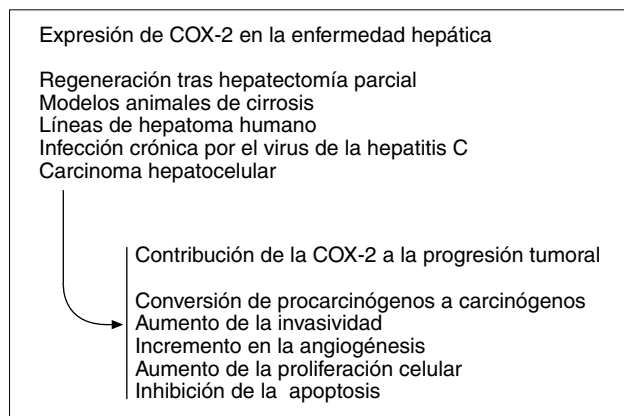


Fig. 1. Implicación de la ciclooxigenasa 2 en la enfermedad hepática.

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*⁹ 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 antisuero 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 ClMg; 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 electroforéticamente cantidades iguales de proteína en un gel SDS poliacrilamida al 10%, en

condiciones desnaturalizantes. 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 autorradiográficas (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

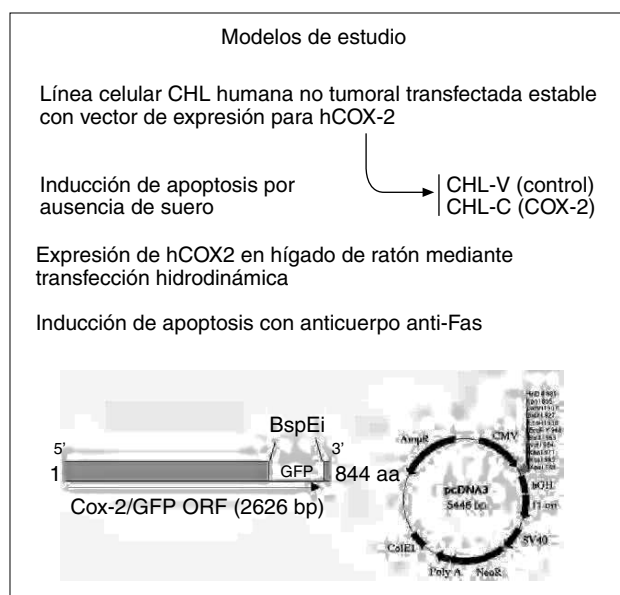


Fig. 2. Modelos para el estudio de la relación de la ciclooxigenasa 2 con el proceso de apoptosis.

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-

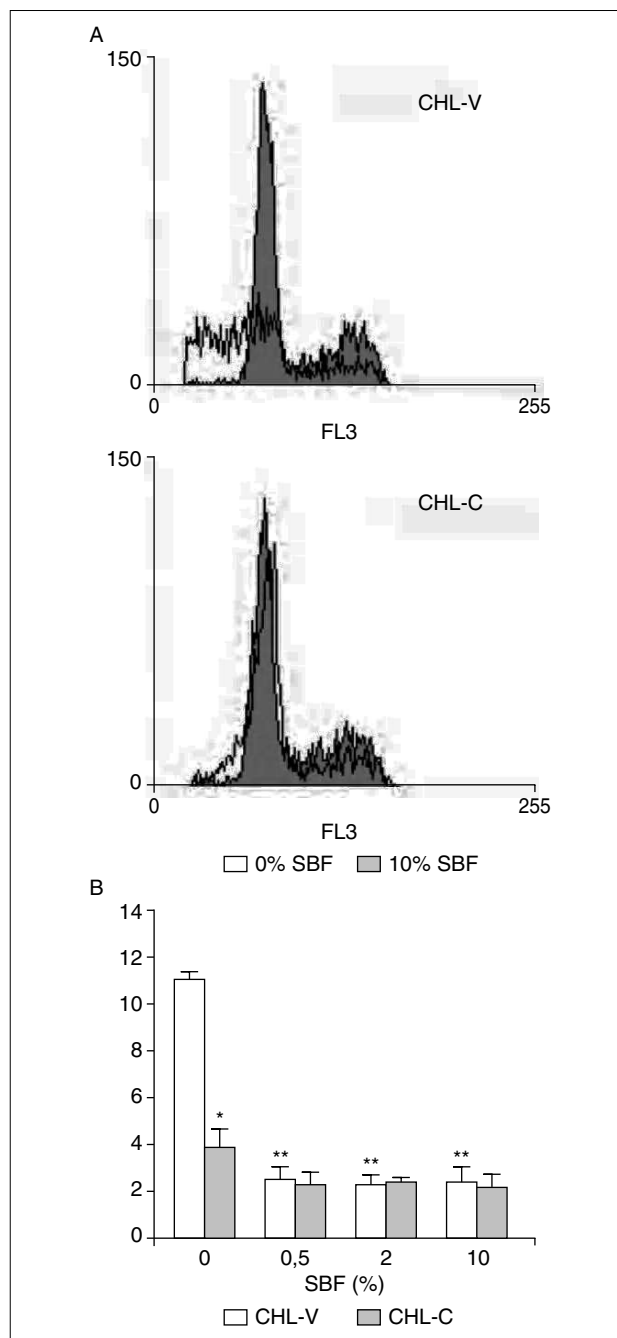


Fig. 3. La expresión de la ciclooxigenasa 2 inhibe la apoptosis en las células hepáticas. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo. (A) Histogramas representativos de tinción con IP en las células CHL-V y CHL-C tras 72 h al 0% y al 10% de SBF. (B) Efecto de la concentración de SBF en el porcentaje de células apoptóticas tras 72 h de cultivo. Todos los datos presentados son la media \pm 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.

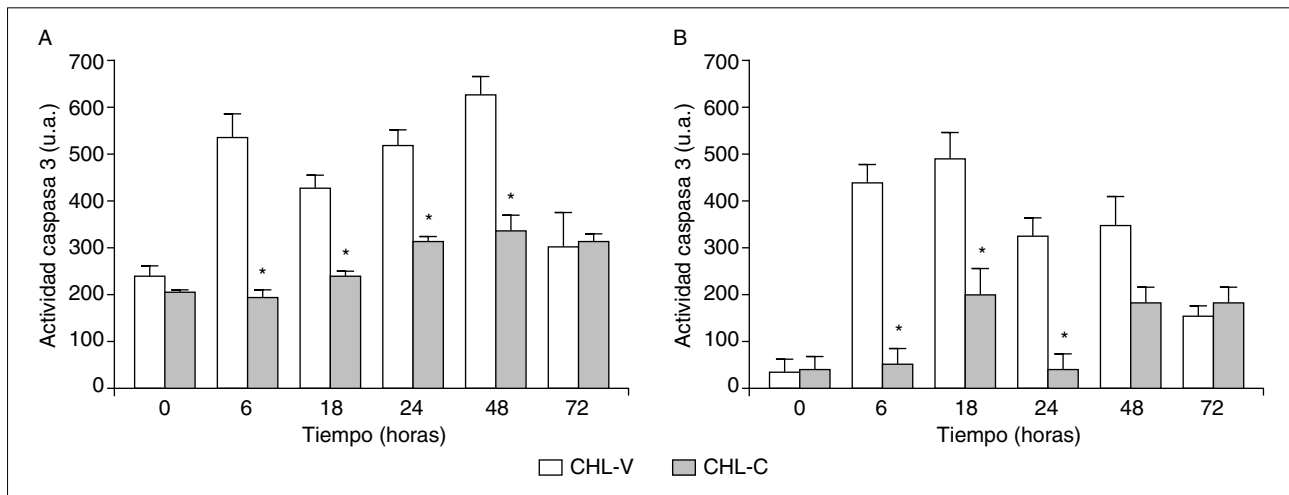


Fig. 4. La expresión de la ciclooxigenasa 2 suprime la actividad de las caspasas. Determinación de la actividad de caspasa 3 (A) y 9 (B) en células control CHL-V y con ciclooxigenasa 2 CHL-C, cultivadas en ausencia de SBF. Todos los datos presentados son la media \pm desviación estándar de 3 experimentos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

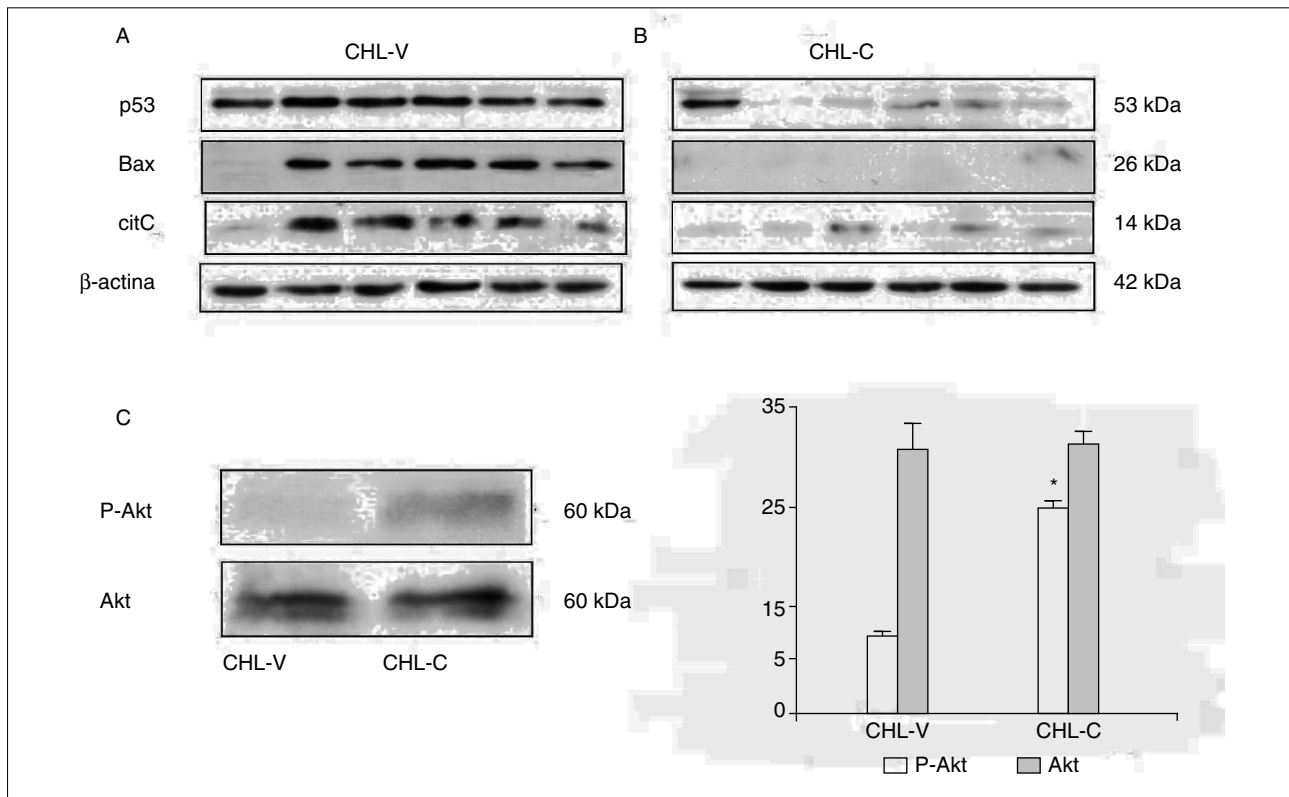


Fig. 5. Cambios en los indicadores de apoptosis en células con expresión estable de ciclooxigenasa 2. Western blot que muestra la expresión de p53 y Bax en las líneas CHL-V y CHL-C en ausencia de SBF y la liberación de citocromo C al citosol (A, B). Normalización con betaactina. Determinación de P-Akt (C, D). Los resultados muestran Western blot representativos y los datos son la media \pm 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 carcino-

ma 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,

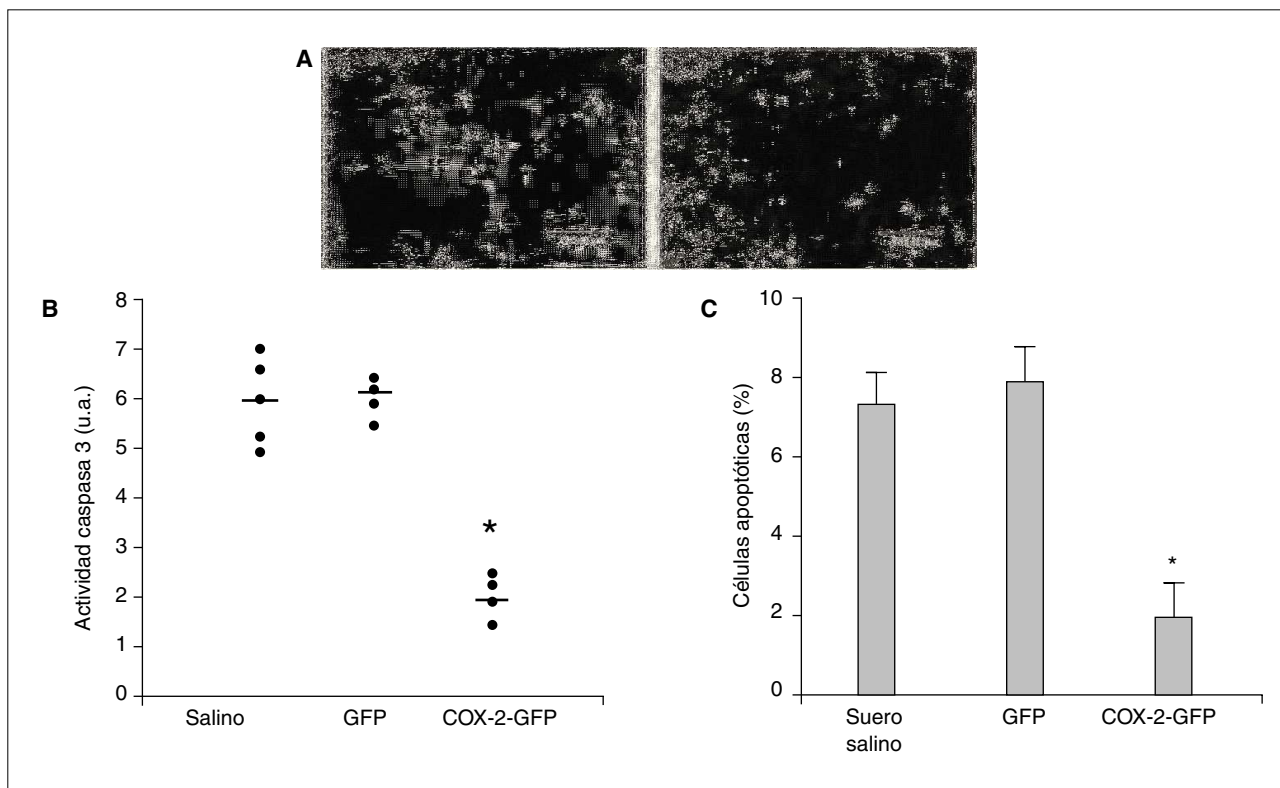


Fig. 6. La transfección hidrodinámica con GFP-COX-2 inhibe la apoptosis inducida por Fas en el hígado. Los ratones fueron transfectados con 100 μ g de plásmido con el gen de GFP o GFP-COX-2. Los animales control fueron inyectados con suero salino. (A) Fluorescencia de GFP en secciones de hígado a 24 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 \pm 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 transitoria o permanentemente 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, Tsujii 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. Talanian 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. Hortalano 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. Tsujii 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.