



FACULTAD DE BIOLOGÍA, CIENCIAS AMBIENTALES Y QUÍMICA

GRADO EN BIOLOGÍA SANITARIA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**Papel de la ciclooxigenasa-2 en el daño por isquemia/reperfusión
en el hígado.**

Autora: Natalia Casanova Melchor
Tutores: María del Carmen Boyano Adánez
Omar Motiño García-Miguel
Paloma Martín-Sanz

2017



FACULTAD DE BIOLOGÍA, CIENCIAS AMBIENTALES Y QUÍMICA

-
GRADO EN BIOLOGÍA SANITARIA
TRABAJO DE FIN DE GRADO

**Papel de la ciclooxigenasa-2 en el daño por isquemia/reperfusión
en el hígado.**

Tribunal de calificación:

(Firma)

Presidente: _____

(Firma)

Vocal 1º: _____

(Firma)

Vocal 2º: _____

Calificación: _____

Fecha: _____

2017

INFORME PARA LA DEFENSA PÚBLICA DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO

D^a María del Carmen Boyano Adánez, profesora del Departamento de Biología de Sistemas de la UAH, como tutora del Trabajo de Fin de Grado en Biología Sanitaria de D^a Natalia Casanova titulado Papel de la ciclooxigenasa-2 en el daño por isquemia/reperfusión en el hígado.

INFORMA:

Alcalá de Henares 29 de junio de 2017

Firma de la tutora

Firma de cotutores

Fdo.: María del Carmen Boyano Adánez

Fdo.: Paloma Martín-Sanz

Fdo.: Omar Motiño García-Miguel

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Ciclooxigenasa (COX).....	1
1.2. Lesión por isquemia/reperfusión (I/R)	3
1.2.1. Lesión hepática inducida por I/R.....	4
1.3. COX-2 y lesión por I/R	5
1.4. Estrés oxidativo.....	6
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1. Modelos animales	8
3.2. Análisis histológico.....	8
3.3. Análisis de la expresión proteica.....	9
3.3.1. Extracción de proteínas	9
3.3.2. Cuantificación de proteínas totales.....	9
3.4. Determinación de las transaminasas: Aspartato aminotransferasa (AST) y Alanina aminotransferasa (ALT)	11
3.5. Determinación de la lactato deshidrogenasa (LDH).....	11
3.6. Extracción y cuantificación de ARN.....	11
3.6.1. RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	12
3.7. Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD)	13
3.8. Determinación de la actividad glutatión peroxidasa (GPx)	14
4. RESULTADOS	15
4.1. Los ratones Tg expresan constitutivamente hCOX-2 en el hígado	15
4.2. La expresión de COX-2 atenúa el grado de necrosis hepática inducida por la I/R	15
4.3. Los niveles plasmáticos de ALT, AST y LDH, marcadores de daño en el tejido, están significativamente reducidos en los ratones Tg.	17
4.4. La expresión constitutiva de COX-2 en el hepatocito aumenta los niveles de ARNm de genes antioxidantes.	18
4.5. Las actividades de las enzimas antioxidantes SOD2 y GPx están aumentadas en los ratones Tg	20
5. DISCUSIÓN	22
6. CONCLUSIONES	24
7. BIBLIOGRAFÍA	25

RESUMEN

La ciclooxigenasa (COX) es la enzima que cataliza el paso limitante en la síntesis de prostanoïdes, entre ellos las prostaglandinas (PGs). Existen dos isoformas de COX: la COX-1, que se expresa constitutivamente en diversos tejidos, y la COX-2 que es inducida por múltiples estímulos como factores de crecimiento, moléculas proinflamatorias y estrés celular. Los hepatocitos adultos expresan COX-2 en respuesta a hepatectomía parcial, al daño hepático agudo y en enfermedades hepáticas crónicas.

La lesión hepática inducida por isquemia-reperfusión (I/R) es una causa importante de morbilidad y mortalidad que puede ocurrir durante el trasplante hepático, resección hepática y shock circulatorio.

Trabajos previos han implicado a COX-2 en la fisiopatología de la lesión por I/R con resultados contradictorios. Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo de este trabajo es determinar el papel de COX-2 en un modelo de daño hepático por I/R en ratones transgénicos para COX-2 humana. Concretamente se pretende determinar el efecto de COX-2 sobre el estrés oxidativo, principal mecanismo fisiopatológico en la lesión por I/R.

Los resultados obtenidos muestran que la expresión de COX-2 en el hepatocito atenúa la muerte celular hepática y el estrés oxidativo, en la lesión inducida por I/R. Dicho efecto es debido, en parte, a un incremento de la expresión y actividad de moléculas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa 2 (SOD2) y la glutatión peroxidasa (GPx).

En conclusión, la expresión constitutiva de COX-2 en el hepatocito protegen contra el daño hepático y estrés oxidativo inducido por I/R.

PALABRAS CLAVE

Ciclooxigenasa-2 (COX-2), prostaglandinas (PGs), hígado, lesión por isquemia/reperfusión (I/R), ratones transgénicos y estrés oxidativo.

ABSTRACT

Cyclooxygenase (COX) is the enzyme that catalyzes the limiting step in prostanoids biosynthesis, including prostaglandins (PGs). There are two isoforms of COX: COX-1 is constitutively expressed in many tissues, and COX-2, which is induced by variety stimuli such as growth, pro-inflammatory factors, and cell stress. Adult hepatocytes express COX-2 in response to partial hepatectomy, acute liver damage or chronic liver disease.

Ischemia-reperfusion hepatic injury (IRI) is an important cause of morbidity and mortality that can occur during liver transplantation, liver resection and circulatory shock.

Previous studies have implicated COX-2 in the pathophysiology of IRI with contradictory results. Given this background, the objective of this work is to determine the contribution of COX-2 in a model of IRI in transgenic mice for human COX-2. Moreover, the effect of COX-2 in oxidative stress, the main pathophysiological mechanism in this injury.

The results obtained show that the expression of COX-2 in hepatocytes attenuates hepatic cell death and oxidative stress in the IRI. This effect is due, in part, to an increase in the expression and activity of antioxidant molecules such as dismutase superoxide 2 (SOD2) and glutathione peroxidase (GPx).

In conclusion, the constitutive expression of COX-2 in the hepatocyte protect against hepatic damage and oxidative stress induced by IRI.

KEYWORDS

Ciclooxigenase 2 (COX-2), prostaglandins (PGs), liver, ischemia-reperfusion injury (IRI), transgenic mice and oxidative stress.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Ciclooxigenasa (COX)*

La ciclooxigenasa (COX), también denominada prostaglandina (PG) G/H sintasa o PG-endoperóxido sintasa, es la enzima que cataliza la reacción limitante de la síntesis de prostanoïdes: PGs y tromboxanos (TXs). Posee dos actividades enzimáticas: COX e hidroxigenasa (HOX). La actividad COX lleva a cabo la oxigenación del ácido araquidónico (AA) dando lugar a un intermedio inestable, la PGG₂, que es reducida por la actividad HOX dando lugar a la PGH₂, sustrato para las enzimas PGs y TX sintasas específicas del tejido, que generan PGE₂, PGI₂, PGD₂ y TXA₂ (*Figura 1*) (Cervello & Montalto, 2006). Estas PGs son importantes para un gran número de procesos fisiológicos en una amplia gama de tejidos. Estos incluyen la modulación de la respuesta inmune, la protección de la mucosa gastrointestinal, mantenimiento de la homeostasis renal y la regulación de la coagulación de la sangre. Además, las PGs también participan en situaciones patológicas promoviendo la inflamación, hinchazón, dolor y fiebre (Greenhough *et al.*, 2009).

Hasta la fecha, se han identificado dos isoformas de COX codificadas por genes distintos que comparten un 61% de la secuencia primaria, pero con funciones diferentes. La COX-1 se expresa constitutivamente en todos los tejidos del organismo, está implicada en la homeostasis celular y tisular mediante el mantenimiento de los niveles de PGs (Tanabe & Tohnai, 2002). La COX-2 está relacionada con enfermedades, incluyendo cáncer, inflamación e hiperalgesia, es indetectable en condiciones basales, a excepción de las vesículas seminales, riñón y ciertas áreas del cerebro. Se expresa en respuesta a la liberación de factores proinflamatorios como interleucina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral alpha (TNF α), interferón gamma (INF γ) y lipopolisacárido (LPS); hormonas como la folículo estimulante (FSH) luteinizante (LH) y estrógenos; factores de crecimiento como factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y; oncogenes como v-Src y v-Ras (Tanabe & Tohnai, 2002).

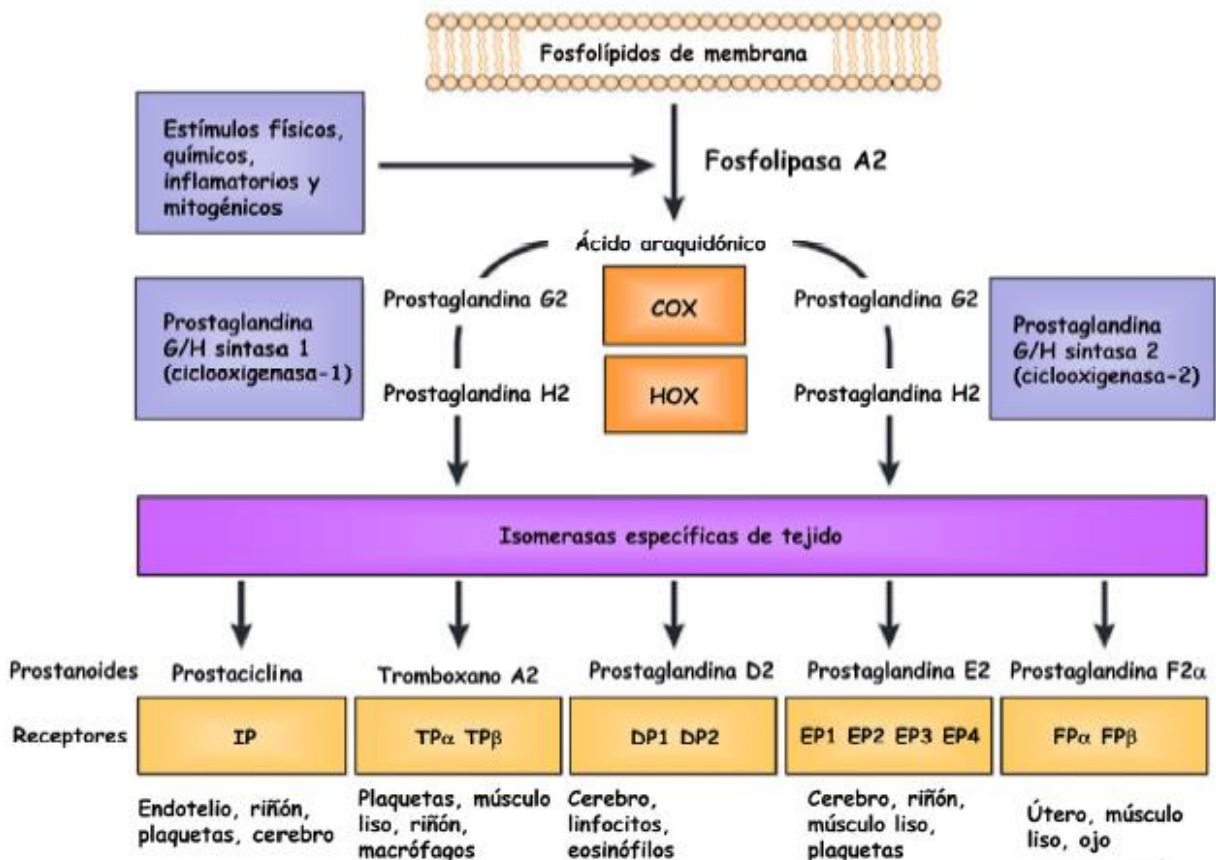


Figura 1. Síntesis de PGs. Modificado de FitzGerald GA (2003).

En el hígado, la expresión de COX-2 se restringe a las células de Kuffer (KCs), esteladas, las células de hepatoma murino y los hepatocitos fetales tras ser estimulados con LPS y citoquinas proinflamatorias (Callejas *et al.*, 2000); sin embargo, los hepatocitos adultos expresan COX-2 en procesos de desdiferenciación y proliferación en respuesta a una hepatectomía parcial, daño hepático agudo o enfermedades hepáticas crónicas (Martín-Sanz *et al.*, 2010).

La PGE₂, principal metabolito de COX-2, cumple su función a través de su unión a receptores específicos de membrana denominados EPs, que pertenecen a la superfamilia de receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G heterotriméricas. Se distinguen 4 subtipos de receptores EPs que se localizan, mayoritariamente, en la membrana

plasmática. El receptor EP1 está acoplado a la proteína Gq, que activa a la fosfolipasa C dando lugar a la formación de inositol-1,4,5-trifosfato, que induce un aumento de Ca^{2+} intracelular, y diacilglicerol, lo que provoca la activación de la proteína quinasa C y la transactivación de la proteína c-Src que promueve la expresión del receptor de EGF (EGFR), estimulando la proliferación e invasión celular. La unión de la PGE_2 a los receptores EP2 y EP4, a través de la proteína estimuladora (Gs), activa la adenilato ciclasa, lo que produce un aumento de los niveles de AMPc y estimulación de la vía de señalización mediada por fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), que promueve la proliferación e inhibe la apoptosis. El receptor EP3, acoplado a la proteína G inhibidora (Gi), inhibe la adenilato ciclasa provocando una disminución en los niveles de AMPc (Dey *et al.*, 2006).

1.2. Lesión por isquemia/reperfusión (I/R)

La lesión por I/R tiene dos fases: la primera es la isquemia en la que el flujo sanguíneo rico en oxígeno está restringido a una parte de un órgano, iniciándose la lesión tisular, y la segunda es la reperfusión que ocurre cuando se alivia la causa de la isquemia y se restituye el oxígeno a través de la circulación (Hossain *et al.*, 2006). Esta restauración del flujo sanguíneo es necesaria para la recuperación de la función celular, pero, a su vez, puede iniciar una cascada de vías metabólicas que empeora la lesión producida por la isquemia inicial (Demiryilmaz *et al.*, 2014).

Durante la isquemia y, como resultado de la reducción del flujo sanguíneo, el suministro de oxígeno a las células es insuficiente, produciéndose una alteración en la cadena respiratoria mitocondrial y, por consiguiente, en la fosforilación oxidativa. Esta inhibición de la fosforilación oxidativa resulta en una reducción de la síntesis de ATP, que causa alteraciones en el intercambio de iones de membrana por la inhibición de la sodio-potasio ATPasa, lo que resulta en una acumulación de sodio intracelular con la correspondiente inflamación y muerte celular. Esta reducción de ATP también altera los mecanismos necesarios para la homeostasis de calcio, dando lugar a una acumulación de calcio intracelular que activa a fosfolipasas de membrana, produciendo la degradación de fosfolípidos y disrupción de membranas

celulares. A su vez, este aumento de calcio estimula la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), dando lugar a un intenso estrés oxidativo y aumento de la permeabilidad mitocondrial, lo que provoca disfunción y muerte celular (Chang *et al.*, 2010; Farag *et al.*, 2016; Glantzounis *et al.*, 2005).

Durante la reperfusión y como consecuencia de las interacciones entre los elementos sanguíneos y el endotelio vascular, se produce la alteración de las células endoteliales, la pérdida del control vasorregulatorio, la activación de los neutrófilos con subsiguiente infiltración endotelial, liberación de enzimas líticas (por ejemplo: proteasas, mieloperoxidasa) y generación de ROS. La sobreproducción de ROS provoca una disminución de los antioxidantes endógenos y un aumento de la peroxidación de ácidos grasos insaturados en las membranas celulares, lo que puede perturbar la fluidez de la misma y la compartimentación de las células dando como resultado la lisis celular (Farag *et al.*, 2016).

En las mitocondrias, normalmente el nivel de calcio es bajo, pero al aumentar el calcio intracelular, la mitocondria puede actuar como un compartimento de almacenamiento de este calcio extra. El calcio provoca la liberación del citocromo c que implica la activación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, dando lugar a una pérdida del potencial eléctrico de la membrana y, por tanto, inhibición de la producción de ATP dando lugar a hinchazón osmótica y rotura de la membrana mitocondrial externa. El aumento del calcio en el interior de la mitocondria y la generación de ROS son los principales contribuyentes a los cambios estructurales mitocondriales que se producen después de episodios de isquemia (Chang *et al.*, 2010).

1.2.1. Lesión hepática inducida por I/R

El hígado es un órgano altamente vascularizado que ejerce un papel fundamental en la homeostasis metabólica, la desintoxicación y la inmunidad. Por ello, este órgano se ve expuesto a una gran cantidad de factores que pueden causar la muerte celular y la disfunción hepática (Duarte *et al.*, 2015).

La lesión hepática inducida por I/R es una causa importante de morbilidad y mortalidad que puede ocurrir durante el trasplante hepático, resección hepática

y shock circulatorio (Abdel-Gaber *et al.*, 2015; Glantzounis *et al.*, 2005). A pesar de las mejoras en las técnicas quirúrgicas y en el cuidado preoperatorio, esta lesión causa hasta un 10% de los fracasos tempranos de trasplante y puede aumentar significativamente la incidencia de rechazo agudo y crónico (Duarte *et al.*, 2014). Los mecanismos fisiopatológicos principales relacionados con esta lesión son: disfunción mitocondrial, producción de ROS y estrés oxidativo (Bellanti *et al.*, 2016). Durante este proceso, también se desencadenan reacciones inflamatorias, dando lugar a la liberación de citoquinas proinflamatorias, tales como el TNF- α , IL-1 β e IL-12 derivada de KCs y/o hepatocitos (Hossain *et al.*, 2006; Ozturk *et al.*, 2006).

1.3. COX-2 y lesión por I/R

La proteína COX-2 no se expresa constitutivamente, de tal forma que es necesario determinar qué papel puede presentar en diferentes situaciones. Varios estudios han demostrado que COX-2 ejerce un papel en el daño generado por I/R en diversos tejidos. Por ejemplo, los efectos de la expresión miocárdica de COX-2 humana (hCOX-2) en I/R se estudiaron en ratones transgénicos (Tg) que expresaban constitutivamente hCOX-2 en cardiomiocitos, demostrándose un aumento de la tolerancia a la lesión por I/R en estos ratones (Inserte *et al.*, 2009). Mediante el uso de ratones *knock out* (KO) para COX-2 y ratones KO para el receptor de prostaciclina, se ha observado que, en condiciones de preconditionamiento, la proteína COX-2 media sus efectos cardioprotectores a través de la regulación positiva de PGI₂ y/o PGE₂ (Guo *et al.*, 2012). Además, mediante el uso de ratones KO para EP4 (receptor de PGE₂) y agonistas de EP4, se ha comprobado que la PGE₂ tiene una potente acción vasodilatadora, un efecto inhibitorio sobre la función de los neutrófilos vía este receptor, y regula la producción de citoquinas, todo ello podría contribuir al efecto cardioprotector, pudiendo usarse agonistas de EP4 como tratamiento para la lesión por I/R en el corazón (Xiao *et al.*, 2004).

Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que la expresión constitutiva de COX-2 en hepatocitos protege frente a la esteatosis, la inflamación, la obesidad y la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en grasa, así como en la esteatohepatitis y fibrosis en diferentes modelos

murinos, sugiriendo un efecto positivo de COX-2 sobre la supervivencia celular, apoptosis y estrés oxidativo (Francés *et al.*, 2013, 2015; Motiño *et al.*, 2016). En este sentido, mediante el empleo de un agonista selectivo del receptor EP4 de PGE₂, se ha observado una disminución significativa de la disfunción hepática durante la lesión por I/R, debida a la disminución de citoquinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión en la fase temprana de la reperfusión, lo que sugiere que PGE₂ tiene un papel importante en la protección hepática (Kuzumoto *et al.*, 2005). Además, se ha descrito que las PGs liberadas principalmente por las KCs durante la fase de reperfusión, ejercen también efectos protectores, gracias a su capacidad de inhibir la generación de ROS, prevenir la migración de leucocitos, reducir la liberación de productos de degradación de la membrana, inhibir la agregación plaquetaria y aumentar la perfusión hepática (Selzner *et al.*, 2003).

Sin embargo, hay estudios en los que se han descrito efectos beneficiosos en la lesión hepática inducida por I/R mediante el uso de inhibidores de COX-2, como el flurbiprofeno, que restaura la función mitocondrial y protege las células hepáticas de la lesión, y el celecoxib, que inhibe la generación de ROS y previene el mal funcionamiento hepático mejorando así la microcirculación hepática (Ozturk *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2012; Farag *et al.*, 2016). Por tanto, debido a la gran controversia que existe, es necesario profundizar en el estudio del papel de COX-2 en la fisiopatología molecular de la I/R para poder identificar nuevas dianas terapéuticas.

1.4. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es uno de los mecanismos fisiopatológicos más importantes en la lesión por I/R. La generación de ROS, como consecuencia de la reintroducción de oxígeno en un tejido que ha sufrido isquemia, es producida principalmente por la mitocondria (Cannistrà *et al.*, 2016). Dicho estrés oxidativo puede dañar las células a través de múltiples mecanismos, incluyendo la peroxidación lipídica, la oxidación del ADN y la desnaturalización enzimática. Además, las ROS pueden activar vías inflamatorias que conducen a la infiltración y acumulación de neutrófilos en el hígado, que activan a otras células inmunes produciendo una lesión mayor (Klune & Tsung, 2010).

El estado antioxidante del tejido afectado por I/R es de gran importancia para la defensa endógena primaria contra la lesión inducida por ROS. Bajo condiciones fisiológicas normales, las células han desarrollado múltiples mecanismos para minimizar este daño oxidativo, incluyendo la inducción de enzimas antioxidantes, que previenen la formación de radicales libres, reparan los daños oxidativos, eliminan las moléculas dañadas y evitan mutaciones (Demiryilmaz *et al.*, 2014; Ninomiya *et al.*, 2011). Dentro de los mecanismos de protección se encuentran el factor de transcripción 2 asociado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) que regula un conjunto de genes que contienen un elemento en cis, denominado elemento de respuesta antioxidante (ARE), que incluye genes que codifican las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y glutathion peroxidasa (GPx), entre otras (Lambertucci *et al.*, 2017). La SOD presenta dos isoformas, la citosólica (SOD1) y la mitocondrial (SOD2), y cataliza la dismutación del anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno (Wang *et al.*, 2016). La GPx se encuentra en el citosol y en las mitocondrias, y constituye uno de los principales sistemas de defensa de la célula contra las ROS, eliminando el peróxido de hidrógeno a través de la oxidación del glutati6n (Cannistrà *et al.*, 2016).

Debido a la gran importancia del estrés oxidativo en la lesión por I/R, es importante determinar la contribuci6n de COX-2 sobre estas moléculas antioxidantes.

2. OBJETIVOS

El objetivo global de este trabajo es determinar la contribuci6n de la prote6na COX-2 en la lesi6n hepática por I/R, empleando ratones Tg que expresan constitutivamente hCOX-2 en el hepatocito. Més específicamente, se pretende analizar la participaci6n de COX-2 en el estrés oxidativo, uno de los mecanismos fisiopatol6gicos más importantes en la lesi6n hepática inducida por I/R.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Modelos animales

En este estudio se utilizaron ratones Tg que expresan constitutivamente la hCOX-2 bajo el control del promotor del gen ApoE humano en el hepatocito y ratones salvajes (Wt) de 8-10 semanas de edad. Los animales se trataron de acuerdo a las instrucciones de cuidado institucional (Comisión de Bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), España).

Los ratones Wt y Tg se dividieron en dos grupos: 1) Grupo Sham (control) a los que se les anestesió y abrió, pero no se les indujo isquemia; 2) Grupo I/R, con lesión hepática inducida por I/R.

La I/R se indujo mediante el bloqueo de la triada portal utilizando una abrazadera microvascular (Biemer clip 0.29-0.39 N) durante 90 minutos, produciendo una isquemia hepática parcial del 70% en el lóbulo medio e izquierdo lateral hepático. Tras dicho bloqueo, se inició la reperfusión retirando la abrazadera microvascular, un grupo de ratones se sometió a 4 horas de reperfusión y otro grupo a 24 horas. Tras la reperfusión, los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical. Una parte del tejido hepático se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C, y la otra se fijó en formalina tamponada al 10% en PBS para realizar posteriormente cortes histológicos. Además, se recogió sangre para su posterior análisis.

3.2. Análisis histológico

Para determinar el grado de necrosis inducido en los ratones tras el proceso de I/R, se realizaron cortes histológicos del hígado de todos los grupos de ratones Wt y Tg, que se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (H&E) en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Madrid, España. Esta técnica consiste en la tinción púrpura de las estructuras ácidas (núcleos), mediante hematoxilina (sustancia básica), y tinción rosa de las estructuras básicas (citoplasma), mediante la eosina (sustancia ácida). El grado de necrosis observado en los cortes se dividió en

cuatro categorías: grado 0 con un 0% de necrosis, grado 1 con un 33% de necrosis, grado 2 con un 66% de necrosis y grado 3 con un 100% de necrosis.

3.3. Análisis de la expresión proteica

3.3.1. Extracción de proteínas

Las muestras de tejido hepático (50 mg) se homogenizaron en 500 μ L de tampón de lisis (0.5% de 3-(3-colamidopropil) dimetilamonio)-1-propanosulfonato (CHAPS), 10 mM Tris HCl pH 7,5, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 10% glicerol) al que se añadieron una combinación de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Sigma Aldrich). A continuación, las muestras se mantuvieron en agitación durante 45 minutos a 4°C. Posteriormente, los homogenados se centrifugaron a 13.000 x g durante 15 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante; este proceso se repitió dos veces para eliminar la máxima cantidad de lípidos que pueden interferir con la determinación proteica posterior. Los sobrenadantes recogidos se conservaron a -80 °C.

3.3.2. Cuantificación de proteínas totales

La determinación de la concentración de proteínas se llevó a cabo mediante el método de Bradford, en el cuál los grupos sulfonados ácidos presentes en el azul de Coomassie (colorante hidrofóbico de color pardo) reaccionan con los grupos amino libres de los aminoácidos básicos de las proteínas produciendo un cambio de color, dando lugar a un azul intenso que se detecta mediante la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

Para cuantificar las proteínas se realizó una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA) y las muestras se emplearon a una dilución 1/20. A todos los tubos se les añadió la solución comercial de Bradford durante 5 minutos en oscuridad. Como blanco se utilizó el tampón de lisis diluido 1/20 en agua. Posteriormente la medida de la absorbancia se llevó a cabo en el lector de placas Synergy HT (BioTek).

3.3.3. Inmunodetección de proteínas: Western Blot

Para la detección de las proteínas, éstas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), donde la migración es proporcional a su peso molecular.

Los extractos proteicos del tejido hepático, se mezclaron con el tampón de carga Laemmli (60 mM Tris HCl pH 6,8, 2% de SDS, 40% de glicerol, 3% de β -mercaptoetanol y 0,005% Azul de Bromofenol) y se calentaron durante 5 minutos a 95°C. Para realizar el *Western Blot* se utilizaron geles de 8% y 12% de poliacrilamida, que se cargaron con 30 μ g de proteínas totales y, posteriormente, se sometieron a 80V-120V durante 2 horas en cubetas específicas utilizando tampón de electroforesis (25 mM de Tris-HCl pH 8,5, 192 mM de glicina y 0.1 % de SDS).

Tras la electroforesis las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) usando un método semi-seco (*Trans-blot SD SEMI-Dry Electroforesis Transfer Cell Instruction Manual*, Bio-Rad Laboratories), durante 37 minutos a 25 V y 1,5 A. A continuación, las membranas se bloquearon durante 1 hora con una disolución de leche desnatada en polvo al 5% en PBS. Posteriormente, las membranas se incubaron con diferentes anticuerpos primarios (*Tabla 1*) durante toda la noche a 4°C.

Tabla 1. Listado de anticuerpos primarios utilizados.

Proteína	Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Dilución
hCOX-2	Anti- hCOX-2	Cayman Chemical	160107	1/1000
MnSOD	Anti- MnSOD	Enzo Life	ADI-SOD-110	1/2000
β -actina	Anti- β -actina	Santa Cruz Biotechnology	A-5441	1/10000

A continuación, tras lavar las membranas 4 veces durante 10 minutos con 0,1% Tween 20-PBS (T-PBS), se incubaron durante 1 hora con los anticuerpos secundarios correspondientes diluidos en leche al 2% en PBS. Finalmente, tras realizar 4 lavados de 10 minutos cada uno con T-PBS, las membranas se

revelaron mediante el protocolo ECL GE Healthcare (Chalfont St Giles, UK) realizando exposiciones a diferentes tiempos, utilizando el equipo de cuantificación de Western blot Image Quant LAS500 (GE Helthcare). El análisis densitométrico de las bandas se realizó mediante el programa informático ImageJ, tras el escaneo de las bandas obtenidas. Los resultados se normalizaron al control de carga de β -actina.

3.4. Determinación de las transaminasas: Aspartato aminotransferasa (AST) y Alanina aminotransferasa (ALT)

Para determinar el daño hepático se midieron las transaminasas empleando kits colorimétricos (BioSystems), mediante los cuales, la actividad catalítica de AST y ALT se determina, empleando la reacción acoplada de la malato deshidrogenasa que utiliza el oxalacetato obtenido de la acción de la AST, y la reacción acoplada de la lactato deshidrogenasa que emplea el piruvato resultante de la acción de la ALT, respectivamente, midiéndose la desaparición de NADH en ambas reacciones. Para la determinación de estas transaminasas se siguió el protocolo del fabricante empleándose 10 μ L de plasma de las diferentes muestras y la cinética de la reacción se midió a 340 nm cada minuto durante 4 minutos a 37°C mediante el lector de placas Synergy HT (BioTek).

3.5. Determinación de la lactato deshidrogenasa (LDH)

La valoración del daño en el tejido hepático se complementó con la determinación de la actividad de la LDH mediante el uso de un kit colorimétrico (BioSystems), determinándose a partir de la desaparición de NADH utilizado para la reducción del piruvato a lactato. Para la medición, se siguió el protocolo del fabricante empleándose 10 μ L de plasma de las diferentes muestras, la cinética de la reacción se midió a 340 nm cada minuto durante 4 minutos a 37°C mediante el lector de placas Synergy HT (BioTek).

3.6. Extracción y cuantificación de ARN

El ARN total se extrajo a partir del homogeneizado del tejido hepático con 1 mL de TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) siguiendo el protocolo del fabricante. A continuación, se añadió a cada muestra 200 μ L de cloroformo y se

agitaron durante 30 segundos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12000 x g durante 15 minutos a 4°C, a los sobrenadantes se les añadió 1 mL de isopropanol y se mantuvieron durante toda la noche a -20°C para precipitar el ARN. Posteriormente, las muestras se centrifugaron de nuevo, el precipitado resultante se lavó varias veces con etanol al 75% y se resuspendió en agua pura libre de nucleasas. Finalmente, la cantidad de ARN se cuantificó utilizando 2 µL de muestra con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y se determinó la calidad y la integridad con el Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, EEUU).

3.6.1. RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

La transcripción inversa de ARN se realizó en un termociclador MyQ (BioRad) con el kit *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania) siguiendo las instrucciones del proveedor.

La PCR cuantitativa de los ARNm se realizó en un volumen final de 20 µL, conteniendo 8 µL de cDNA, 0,5 µM de los cebadores y 10 µL de *FastStart Universal SYBR Green Master* (Roche). El programa de la PCR consistió en: 10 minutos a 95°C seguido de 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Los oligos utilizados así como sus secuencias se indican en la *Tabla 2*.

Como control endógeno se utilizó el gen 36b4 (codifica una proteína de la subunidad mayor del ribosoma con una secuencia altamente conservada en diferentes organismos) y mediante el cual se normalizaron los triplicados de las diferentes muestras. La expresión relativa de los ARNm se calculó mediante el método comparativo $\Delta\Delta C_t$.

Tabla 2. Listado de oligos utilizados.

Nombre oligo	Casa comercial	Secuencia
<i>Sod1</i>	Invitrogen	F: 5'-TCAGTGCTCACTCGTGTCAT-3' R: 5'-ACACGATAGGTTTGGGCATA-3'
<i>Sod2</i>	Invitrogen	F: 5'-TGTGTCCATTGAAGATCGTG-3' R: 5'-CTTTGCCCAAGTCATCTTGT-3'
<i>Nrf2</i>	Invitrogen	F: 5'-CAGTCTTCACTGCCCTCAT-3' R: 5'-TCTGTCAGTGTGGCTTCTGG-3'
<i>Gpx</i>	Invitrogen	F: 5'-ATCGACATCGAACCTGACAT-3' R: 5'-GAGTGCAGCCAGTAATCACC-3'
<i>36b4</i>	Invitrogen	F: 5'-AGATGCAGCAGATCCGCAT-3' R: 5'-GTTCTTGCCCATCAGCACC -3'

3.7. Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD)

Para comprobar la contribución de COX-2 al estrés oxidativo, se determinó la actividad de la SOD mediante la inhibición de la reducción fotoquímica del azul de nitrotetrazolio (NBT; Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, EEUU), por acción de esta enzima. Para ello, se prepararon geles de poliacrilamida (PAGE) al 12%, que se cargaron con 35 µg de proteína en Laemmli Buffer sin β-mercaptoetanol ni SDS, y se desarrolló una electroforesis nativa a un voltaje de 15 mA/gel y a 4°C. Posteriormente, los geles se equilibraron en un tampón (50 mM K₃PO₄, 1 mM EDTA y pH 7,8) durante 30 minutos con agitación suave a temperatura ambiente. A continuación, el gel se incubó con un tampón compuesto por 10 mL de tampón de equilibrado, 0,24 mM de NBT, 33,2 µM de riboflavina (Sigma Chemical Co) y 0,2% de TEMED (Sigma Chemical Co) durante 30 minutos y en oscuridad.

La actividad SOD se reveló tras exposición a luz blanca, que da lugar a la aparición de bandas claras sobre un fondo azul. La cuantificación de las bandas se realizó por densitometría utilizando el programa informático ImageJ, tras el escaneo de las bandas obtenidas en el gel.

3.8. Determinación de la actividad glutatión peroxidasa (GPx)

También se determinó la actividad de la enzima antioxidante GPx empleando un kit colorimétrico (Enzo Life Sciences). El método se basa en sucesivas reacciones de óxido-reducción empleando NADPH, siendo la absorbancia proporcional a la actividad de GPx. Para la medida se siguió el protocolo del fabricante empleándose 20 μ L de extracto total de las diferentes muestras disueltas 1/6 en el tampón de ensayo. La cinética de la reacción se midió a 340 nm cada minuto durante 15 minutos a 25°C, mediante el lector de placas Synergy HT (BioTek).

3.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico de las diferencias entre los distintos grupos se realizó mediante las pruebas de ANOVA y Mann-Whitney, utilizándose el programa GraphPad Prism 5. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM) y considerando un valor de $p < 0,05$ estadísticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1. Los ratones Tg expresan constitutivamente hCOX-2 en el hígado

En primer lugar, se confirmó la expresión constitutiva de la hCOX-2 en los ratones Tg, para probar el correcto funcionamiento del modelo de transgénesis, en extractos proteicos de hígado de ratones Wt y Tg, mediante la técnica de *Western Blot*. Como se muestra en la *Figura 2*, solo se detectó la expresión de COX-2 en los hígados de los ratones Tg tanto a las 4 como 24 horas de reperfusión.

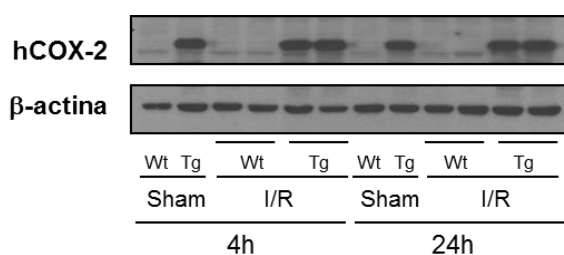


Figura 2. hCOX-2 se expresa constitutivamente en el hígado de los ratones Tg. *Western Blot* representativo (6 animales por genotipo) de la expresión de la proteína hCOX-2 en extracto totales de hígados de ratones Wt y Tg, utilizando como control de carga β-actina.

4.2. La expresión de COX-2 atenúa el grado de necrosis hepática inducida por la I/R.

Para determinar si la expresión de COX-2 en el hepatocito protege frente al daño por I/R, se utilizó un modelo animal de I/R, que consiste en el bloqueo del flujo sanguíneo en la triada portal y posterior reoxigenación, simulando el daño generado por la I/R.

Tras el análisis de los cortes hepáticos teñidos con H&E, se observa que tanto a las 4 como a las 24 horas de reperfusión (*Figura 3.A*), hay un menor número de focos necróticos en los ratones Tg respecto a los Wt, siendo mayor el área de necrosis a las 24 horas en ambos genotipos.

Además, se evaluó el grado de necrosis en estos mismos cortes y, como se puede observar en la *Figura 3.B*, a las 4 horas de reperfusión los ratones Tg

presentan un menor grado de necrosis, con una media de 0,5, frente a los ratones Wt en los que ésta se sitúa en torno a 1,5. A las 24 horas de reperusión estos valores aumentan por la mayor área de necrosis, pero el grado sigue siendo menor en los Tg (media de 1,5 frente a 2,5 en los Wt). Tanto a las 4 como a las 24 horas de tratamiento, estas diferencias observadas en el grado de necrosis son significativas.

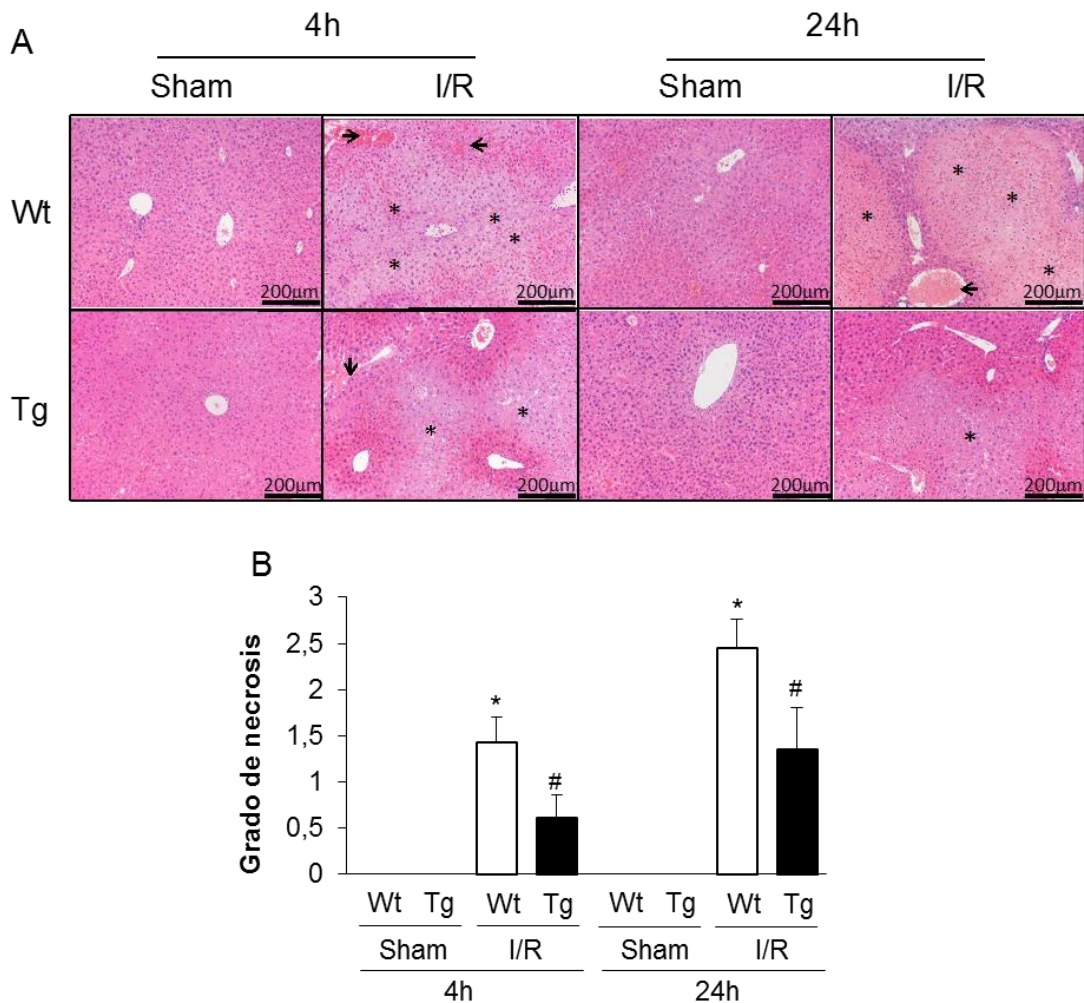


Figura 3. Los ratones Tg están protegidos frente a la lesión hepática inducida por I/R. (A) Imágenes representativas de cortes de tejido hepático teñidos con H&E de ratones Wt/Tg Sham e I/R recogidas a las 4 y 24 horas de reperusión. (B) Análisis del grado de necrosis en ratones Wt/Tg Sham e I/R recogidas a las 4 y 24 horas de reperusión. Los datos se representan como la media \pm SEM. (n=8) *p<0,05 vs. Wt Sham, # p<0,05 vs. Wt I/R.

4.3. Los niveles plasmáticos de ALT, AST y LDH, marcadores de daño en el tejido, están significativamente reducidos en los ratones Tg.

El daño hepático se determinó mediante el análisis de los niveles plasmáticos de LDH, marcador de daño tisular y los niveles plasmáticos de ALT y AST, marcadores de daño hepático, siendo la primera más específica que la segunda, en los ratones Sham y los sometidos a I/R. Como se observa en la *Figura 4.A*, las concentraciones de ALT y AST son similares en ratones Wt y Tg Sham. En cambio tras la I/R, en los ratones Tg los valores de actividad ALT y AST son menores en comparación con los Wt. Estas diferencias se aprecian tanto a las 4 horas como a las 24 horas de reperfusión, reduciéndose la significatividad a las 24 horas.

Además, para constatar este daño en el hígado se determinaron los niveles plasmáticos de LDH (*Figura 4.B*), observándose una mayor actividad en los ratones Wt sometidos a I/R tanto a las 4 como a las 24 horas de reperfusión con respecto a los Tg, pero estas diferencias son estadísticamente significativas únicamente a las 4 horas. Estos resultados son indicativos de que en los ratones Tg, la proteína COX-2 ejerce un papel protector, disminuyendo el daño hepático.

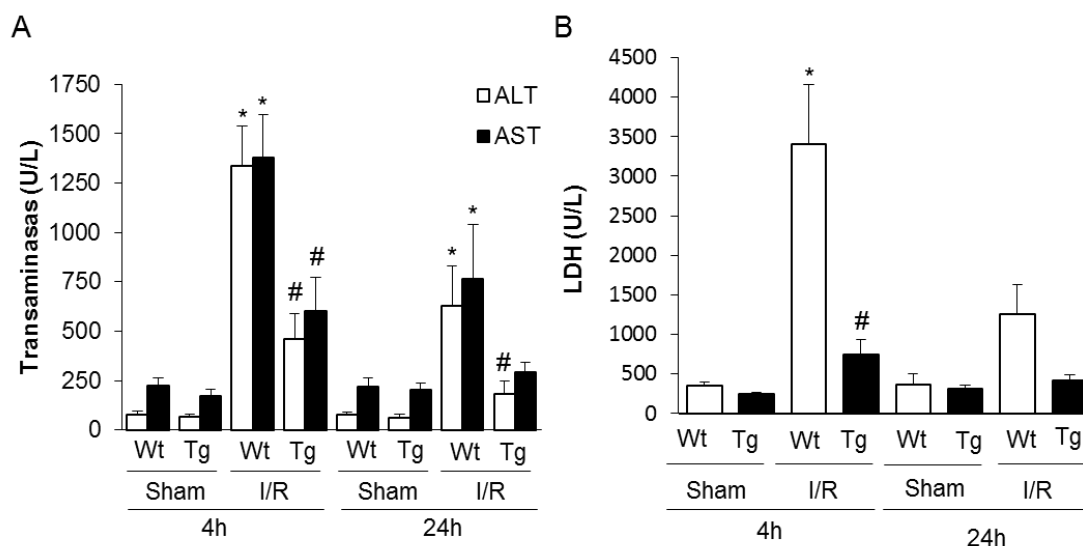


Figura 4. La expresión de COX-2 en el hepatocito protege frente al daño hepático inducido por I/R, reduciendo los niveles plasmáticos de AST, ALT y LDH. (A-B) Actividades AST, ALT y LDH analizadas espectrofotométricamente. Los datos se representan como la media \pm SEM. (n=8) *p<0,05 vs. Wt Sham, # p<0,05 vs. Wt I/R.

4.4. La expresión constitutiva de COX-2 en el hepatocito aumenta los niveles de ARNm de genes antioxidantes.

Teniendo en cuenta los resultados descritos anteriormente, que demuestran el papel protector de COX-2 frente al daño inducido por la I/R, se decidió profundizar en los mecanismos que pudieran explicar dicha protección. Para ello, se analizaron los niveles hepáticos de genes relacionados con procesos antioxidantes como por ejemplo *Nrf2*, *Gpx*, *Sod 1* y *Sod 2*, mediante RT-qPCR. Como se puede observar en la *Figura 5.A-D* a las 4 horas de reperusión, en los ratones Tg sometidos a I/R los niveles de ARNm de los genes analizados son significativamente mayores respecto a los Wt. Sin embargo, a las 24 horas, estas diferencias se reducen drásticamente, incluso los niveles de ARNm de los ratones sometidos a I/R son menores que los ratones Sham. Estos niveles elevados de ARNm de genes antioxidantes en los ratones Tg, podrían explicar parcialmente el papel protector de COX-2 frente al estrés oxidativo producido en la lesión por I/R.

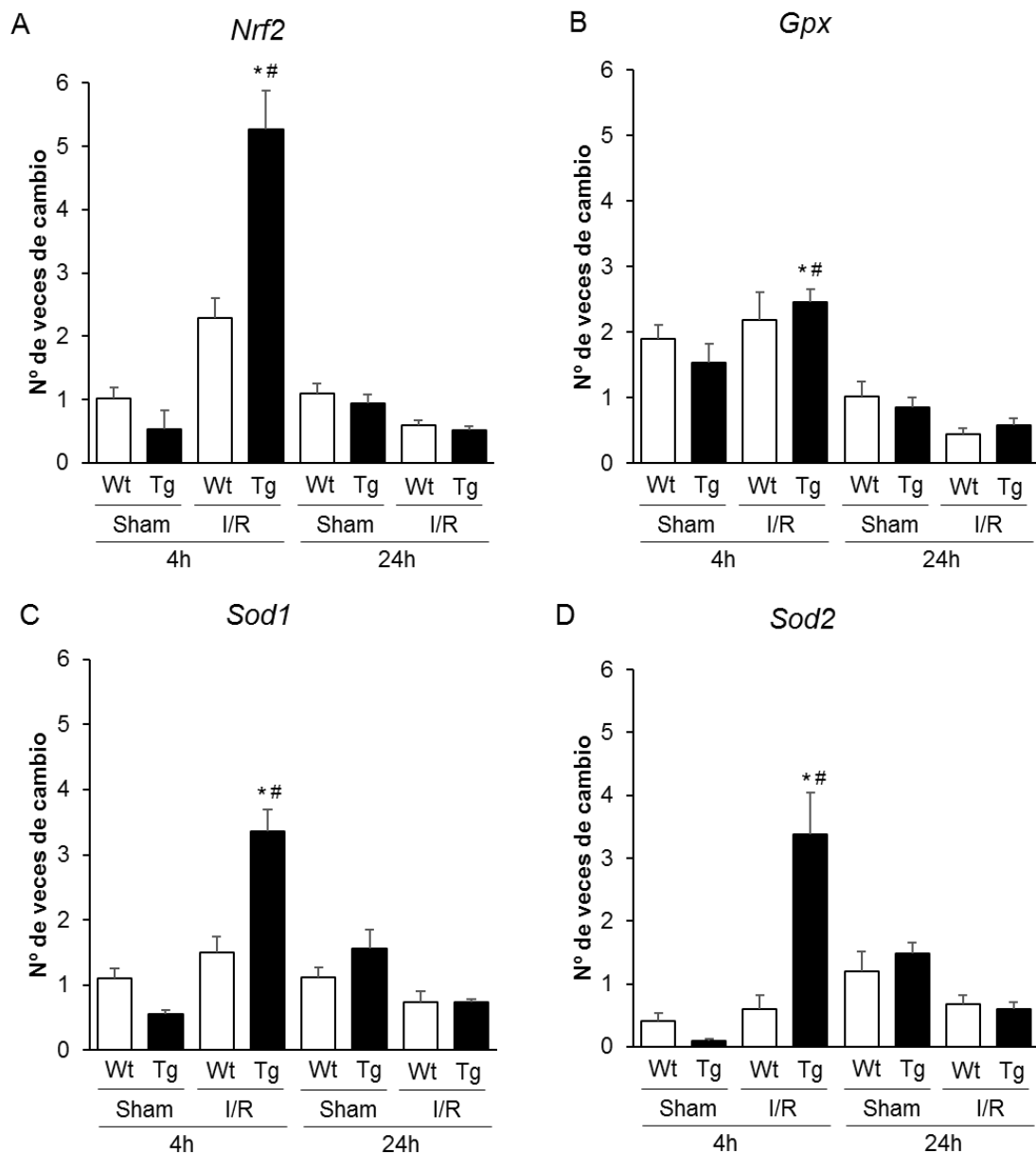


Figura 5. COX-2 induce la expresión hepática de genes diana relacionados con procesos antioxidantes. (A-D) Análisis de los niveles de expresión de ARNm de los genes *Nrf2*, *Gpx*, *Sod 1* y *Sod 2*, respectivamente, en las muestras hepáticas de ratones obtenidas a las 4 horas y 24 horas de reperusión. Los datos se normalizaron con el gen endógeno 36b4 y representados como número de veces de cambio respecto al Wt Sham 4 horas y 24 horas. Los datos se representan como la media \pm SEM. (n=8) * $p < 0,05$ vs. Wt Sham, # $p < 0,05$ vs. Wt I/R.

4.5. Las actividades de las enzimas antioxidantes SOD2 y GPx están aumentadas en los ratones Tg

Además de analizar los niveles de ARNm de los genes relacionados con la capacidad antioxidante, se determinaron las actividades enzimáticas de SOD2 y GPx, proteínas antioxidantes, importantes para la protección frente al estrés oxidativo. La actividad de SOD2 se midió mediante electroforesis nativa (*Figura 6.A*) y posterior densitometría de las bandas obtenidas (*Figura 6.B*). Se puede observar una mayor actividad de SOD2 en los ratones Tg sometidos a I/R tanto a las 4 como a las 24 horas de reperusión en comparación con los Wt, siendo estas diferencias estadísticamente significativas únicamente a las 4 horas. Estos datos se corroboraron mediante el estudio de la expresión de la proteína SOD2 por *Western Blot* (*Figura 6.C*). Tras la I/R, se observó que la expresión de dicha proteína era mayor en los ratones Tg en comparación con los Wt.

Con respecto a la actividad de la GPx (*Figura 6.D*), también se observan diferencias significativas en los ratones Tg frente a los Wt a las 24 horas de reperusión. A las 4 horas de reperusión se observa la tendencia, pero sin ser significativa la diferencia entre Wt y Tg.

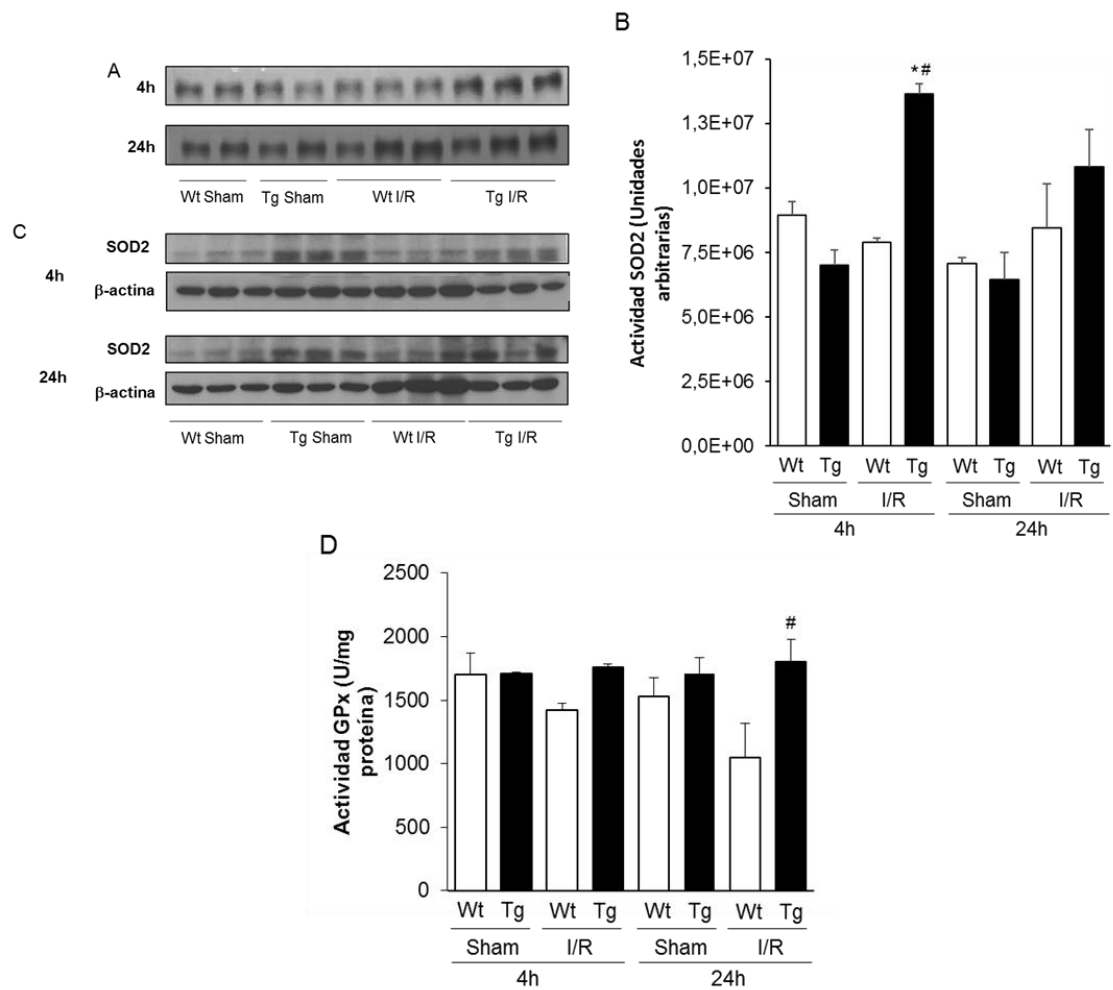


Figura 6. La expresión constitutiva de COX-2 induce la activación en el hígado de las enzimas SOD2 y GPx implicadas en procesos antioxidantes (A) Imagen del gel representativo de la actividad SOD2. (B) Análisis densitométrico de las bandas obtenidas en el gel de actividad SOD2. (C) *Western Blot* representativo de la proteína SOD2. (D) Determinación de la actividad GPx en hígado de ratones a las 4 y 24 horas de reperusión. Los datos se representan como la media \pm SEM. (n=8) *p<0,05 vs. Wt Sham, #p<0,05 vs. Wt I/R.

5. DISCUSIÓN

La lesión hepática por I/R es frecuente durante el trasplante y la resección hepática, y conduce a una respuesta inflamatoria aguda, causando daño hepatocelular y disfunción de órganos. La fase inicial de la lesión por I/R está asociada con la generación de ROS, la activación de KCs y una respuesta temprana de activación de neutrófilos; posteriormente, las KCs activadas liberan diversos metabolitos que causan daño celular, incluyendo radicales superóxido, óxido nítrico, eicosanoides, proteasas y citoquinas proinflamatorias que promueven la infiltración de células inflamatorias en el hígado, contribuyendo a la lesión (Akahori *et al.*, 2007; Montalvo-Jave *et al.*, 2008).

Las PGs dependientes de COX-2 se consideran mediadores proinflamatorios que están implicados en la patogénesis de múltiples enfermedades (Wang & Dubois, 2010). Además, la inflamación induce la expresión de COX-2 (Simmons *et al.*, 2004). Sin embargo, la expresión de COX-2 en el hepatocito adulto se restringe a determinados procesos de desdiferenciación y proliferación en respuesta a una hepatectomía parcial, a un daño hepático agudo y a enfermedades hepáticas crónicas (Martín-Sanz *et al.*, 2010), por lo que la expresión ectópica de COX-2 en los hepatocitos constituye una condición ideal para el estudio del papel de COX-2 en la patología hepática. En este trabajo, se ha estudiado el papel de COX-2 en la lesión hepática inducida por I/R en un modelo murino. Los resultados obtenidos demuestran que la expresión constitutiva de COX-2 en el hepatocito protege frente a la lesión por I/R.

Existen estudios que sugieren una mejoría en la lesión hepática mediante el tratamiento con misoprostol (análogo de PGE_{1/2}) y beraprost (análogo de PGI₂), proporcionando una fuerte evidencia de que los efectos protectores de COX-2 están mediados a través de la producción de PGE₂ y PGI₂, gracias a sus funciones antiinflamatorias y citoprotectoras (Yin *et al.*, 2007). Sin embargo, hay estudios en los que se han descrito beneficios en la lesión hepática inducida por I/R mediante el uso de inhibidores de COX-2 como el flurbiprofeno y el celecoxib (Ozturk *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2012; Farag *et al.*, 2016). En este sentido, se comprobó el efecto global de COX-2 sobre la lesión por I/R; para

ello, se analizó el grado de necrosis de diferentes cortes hepáticos teñidos con H&E y los niveles plasmáticos de ALT, AST y LDH, marcadores de daño tisular. Tanto el grado de necrosis como los niveles de ALT, AST y LDH son menores en los ratones Tg, es decir, la COX-2 tiene un papel protector disminuyendo el daño causado por la I/R en los ratones que la expresan constitutivamente en el hepatocito.

En trabajos previos, se ha estudiado el efecto de la PGJ₂, PG con funciones antiinflamatorias y protectoras en diversos tipos celulares, en un modelo murino de I/R observándose: una reducción de la necrosis hepática, de los niveles séricos de ALT y AST, inflamación (TNF- α e IL-1 β), infiltración de macrófagos (F4/80), activación de las KCs, apoptosis (ratio Bcl-2/BaX), autofagia (Beclina-1 y LC3) y una activación de Nrf2 (Chen *et al.*, 2017). Además, se ha demostrado que el uso de un agonista selectivo del receptor EP4 de PGE₂, da lugar a una disminución de citoquinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión en la fase temprana de la reperfusión, disminuyendo la disfunción hepática (Kuzumoto *et al.*, 2005).

El aumento de la generación de ROS, produce un gran estrés oxidativo, que se ha sugerido como uno de los principales mecanismos fisiopatológicos presentes en la lesión por I/R (Kalogeris *et al.*, 2014). Debido a la gran importancia de este estrés oxidativo en la lesión producida por I/R, este trabajo se ha centrado en la relación de COX-2 con las moléculas antioxidantes Nrf2, GPx, SOD1 y SOD2. Para ello, se han estudiado los niveles de ARNm de *Nrf2*, *Gpx*, *Sod1* y *Sod2*, comprobándose una mayor expresión de estos genes en los ratones Tg con respecto a los Wt. Por tanto, COX-2 atenúa el daño hepático en los ratones Tg, a través del aumento de la expresión de moléculas antioxidantes, sugiriendo una menor generación de ROS.

Tras el estudio de los ARNm, se determinó la actividad enzimática de SOD2 y GPx, observándose también niveles mayores en los ratones Tg respecto a los Wt. En este sentido, se ha demostrado que la inactivación de SOD2 da como resultado un aumento de la lesión hepática, lo que sugiere que la susceptibilidad de los hepatocitos se ve reforzada por el deterioro de la defensa antioxidante mitocondrial (Wang *et al.*, 2016). Por tanto, COX-2 protege frente a

la lesión por I/R, aumentando la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes que son capaces de combatir el estrés oxidativo, uno de los principales mecanismos fisiopatológicos que se produce durante la I/R.

La PGE₁ administrada intravenosamente se ha utilizado experimentalmente en ensayos clínicos, observándose efectos beneficiosos en la supervivencia del trasplante en pacientes con fallo hepático fulminante (Gatta *et al.*, 2006). En la actualidad, se emplean diferentes tratamientos para mejorar esta lesión (Selzner *et al.*, 2003), pero muchos de ellos con gran cantidad de efectos secundarios y, además, muchos mecanismos implicados no se conocen por completo, por lo que es necesario un mayor estudio para poder mejorar el tratamiento.

6. CONCLUSIONES

- La expresión constitutiva de COX-2 en el hepatocito protege frente a la lesión inducida por I/R mediante:
 - Disminución de la necrosis hepática y, como consecuencia, se produce la reducción de los marcadores de daño hepático ALT, AST y LDH.
 - Reducción del estrés oxidativo a través del aumento de la expresión de *Nrf2*, *Sod1*, *Sod2* y *GPx* y de la actividad de SOD2 y GPx en el hígado.
- La expresión de COX-2 podría desempeñar un papel clave en la fisiopatología de la lesión por I/R, pudiendo llegar a ser una potencial diana terapéutica, para evitar la lesión en pacientes sometidos a trasplante hepático, resección hepática y shock circulatorio.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Gaber, S. A., Ibrahim, M. A., Amin, E. F., Ibrahim, S. A., Mohammed, R. K., & Abdelrahman, A. M., 2015. Effect of selective versus non-selective cyclooxygenase inhibitors on ischemia–reperfusion-induced hepatic injury in rats. *Life Sciences*, 134, pp.42–48.

Akahori, T., Sho, M., Hamada, K., Suzaki, Y., Kuzumoto, Y., Nomi, T., Nakamura, S., Enomoto, K., Kanehiro, H., & Nakajima, Y., 2007. Importance of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Journal of Hepatology*, 47(6), pp.784–792.

Bellanti, F., Mirabella, L., Mitarotonda, D., Blonda, M., Tamborra, R., Cinnella, G., Fersini, A., Ambrosi, A., Dambrosio, M., Vendemiale, G., & Serviddio, G., 2016. Propofol but not sevoflurane prevents mitochondrial dysfunction and oxidative stress by limiting HIF-1 α activation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 96, pp.323–333.

Callejas, N. A., Boscá, L., Williams, C. S., DuBOIS, R. N., & Martín-Sanz, P., 2000. Regulation of cyclooxygenase 2 expression in hepatocytes by CCAAT/enhancer-binding proteins. *Gastroenterology*, 119(2), pp.493–501.

Cannistrà, M., Ruggiero, M., Zullo, A., Gallelli, G., Serafini, S., Maria, M., Naso, A., Grande, R., Serra, R., & Nardo, B., 2016. Hepatic ischemia reperfusion injury: A systematic review of literature and the role of current drugs and biomarkers. *International Journal of Surgery*, 33, pp.S57–S70.

Cervello, M., & Montalto, G., 2006. Cyclooxygenases in hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 12(32), pp.5113–5121.

Chang, W. J., Chehab, M., Kink, S., & Toledo-Pereyra, L. H., 2010. Intracellular Calcium Signaling Pathways during Liver Ischemia and Reperfusion. *Journal of Investigative Surgery*, 23(4), pp.228–238.

Chen, K., Li, J., Li, S., Feng, J., Liu, T., Wang, F., Dai, W., Xia, Y., Lu, J., Zhou, Y., & Guo, C., 2017. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ alleviates hepatic ischemia-reperfusion injury in mice via inducing antioxidant response and inhibiting apoptosis and autophagy. *Acta Pharmacologica Sinica*. 38(5), pp.672-687.

- Demiryilmaz, I., Turan, M. I., Kisaoglu, A., Gulapoglu, M., Yilmaz, I., & Suleyman, H., 2014. Protective effect of nimesulide against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats: effects on oxidant/antioxidants, DNA mutation and COX-1/COX-2 levels. *Pharmacological Reports: PR*, 66(4), pp.647–652.
- Dey, I., Lejeune, M., & Chadee, K., 2006. Prostaglandin E₂ receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *British Journal of Pharmacology*, 149(6), pp.611–623.
- Duarte, S., Baber, J., Fujii, T., & Coito, A. J., 2015. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biology*, 44, pp.147–156.
- Duarte, S., Kato, H., Kuriyama, N., Suko, K., Ishikawa, T.-O., Busuttil, R. W., Herschman, H. R., & Coito, A. J., 2014. Hepatic Ischemia and Reperfusion Injury in the Absence of Myeloid Cell-Derived COX-2 in Mice. *PLoS ONE*, 9(5), p. e96913.
- Farag, M. M., Khalifa, A. A., Elhadidy, W. F., & Rashad, R. M., 2016. Hepatorenal protection in renal ischemia/reperfusion by celecoxib and pentoxifylline. *Journal of Surgical Research*, 204(1), pp.183–191.
- FitzGerald, G. A., 2003. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nature Reviews. Drug discovery*, 2, pp. 879-890.
- Francés, D. E. A., Ingaramo, P. I., Mayoral, R., Través, P., Casado, M., Valverde, Á. M., Martín-Sanz, P., & Carnovale, C. E., 2013. Cyclooxygenase-2 over-expression inhibits liver apoptosis induced by hyperglycemia. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(3), pp.669–680.
- Francés, D. E., Motiño, O., Agrá, N., González-Rodríguez, Á., Fernández-Álvarez, A., Cucarella, C., Mayoral, R., Castro-Sánchez, L., García-Casarrubios, E., Boscá, L., Carnovale, C. E., Casado, M., Valverde, Á. M., & Martín-Sanz, P., 2015. Hepatic Cyclooxygenase-2 Expression Protects Against Diet-Induced Steatosis, Obesity, and Insulin Resistance. *Diabetes*, 64(5), pp.1522–1531.
- Fu, H., Chen, H., Wang, C., Xu, H., Liu, F., Guo, M., Wang, Q., & Shi, X., 2012. Flurbiprofen, a cyclooxygenase inhibitor, protects mice from hepatic

ischemia/reperfusion injury by inhibiting GSK-3 β signaling and mitochondrial permeability transition. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 18, pp.1128–1135.

Gatta, A., Dante, A., Gaudio, M. Del, Pinna, A. D., Ravaioli, M., Riganello, I., Volta, G., & Faenza, S., 2006. The Use of Prostaglandins in the Immediate Postsurgical Liver Transplant Period. *Transplantation Proceedings*, 38, pp.1092-1095.

Glantzounis, G. K., Salacinski, H. J., Yang, W., Davidson, B. R., & Seifalian, A. M., 2005. The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury: A review. *Liver Transplantation*, 11(9), pp.1031–1047.

Greenhough, A., Smartt, H. J. M., Moore, A. E., Roberts, H. R., Williams, A. C., Paraskeva, C., & Kaidi, A., 2009. The COX-2/PGE₂ pathway: Key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*, 30(3), pp.377–386.

Guo, Y., Tukaye, D. N., Wu, W.-J., Zhu, X., Book, M., Tan, W., Jones, S. P., Rokosh, G., Narumiya, S., Li, Q., & Bolli, R., 2012. The COX-2/PGI₂ receptor axis plays an obligatory role in mediating the cardioprotection conferred by the late phase of ischemic preconditioning. *PloS One*, 7(7), p.e41178.

Hossain, M. A., Wakabayashi, H., Izuishi, K., Okano, K., Yachida, S., & Maeta, H., 2006. The role of prostaglandins in liver ischemia-reperfusion injury. *Current Pharmaceutical Design*, 12(23), pp.2935–2951.

Inserte, J., Molla, B., Aguilar, R., Través, P. G., Barba, I., Martín-Sanz, P., Boscá, L., Casado, M., & Garcia-Dorado, D., 2009. Constitutive COX-2 activity in cardiomyocytes confers permanent cardioprotection Constitutive COX-2 expression and cardioprotection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46(2), pp.160–168.

Kalogeris, T., Bao, Y., & Korthuis, R. J., 2014. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biology*, 2, pp.702–714.

Klune, J. R., & Tsung, A., 2010. Molecular Biology of Liver

Ischemia/Reperfusion Injury: Established Mechanisms and Recent Advancements. *Surgical Clinics of North America*, 90(4), pp.665–677.

Kuzumoto, Y., Sho, M., Ikeda, N., Hamada, K., Mizuno, T., Akashi, S., Tsurui, Y., Kashizuka, H., Nomi, T., Kubo, A., Kanehiro, H., & Nakajima, Y., 2005. Significance and therapeutic potential of prostaglandin E₂ receptor in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Hepatology*, 42(3), pp.608–617.

Lambertucci, F., Motiño, O., Villar, S., Rigalli, J. P., de Luján Alvarez, M., Catania, V. A., Martín-Sanz, P., Carnovale, C. E., Quiroga, A. D., Francés, D. E., & Ronco, M. T., 2017. Benznidazole, the trypanocidal drug used for Chagas disease, induces hepatic NRF2 activation and attenuates the inflammatory response in a murine model of sepsis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 315, pp.12–22.

Martín-Sanz, P., Mayoral, R., Casado, M., & Boscá, L., 2010. COX-2 in liver, from regeneration to hepatocarcinogenesis: What we have learned from animal models? *World Journal of Gastroenterology*, 16(12), pp.1430–1435.

Montalvo-Jave, E. E., Escalante-Tattersfield, T., Ortega-Salgado, J. A., Piña, E., & Geller, D. A., 2008. Factors in the Pathophysiology of the Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of Surgical Research*, 147(1), pp.153–159.

Motiño, O., Agra, N., Brea Contreras, R., Domínguez-Moreno, M., García-Monzón, C., Vargas-Castrillón, J., Carnovale, C. E., Boscá, L., Casado, M., Mayoral, R., Valdecantos, M. P., Valverde, Á. M., Francés, D. E., & Martín-Sanz, P., 2016. Cyclooxygenase-2 expression in hepatocytes attenuates non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1862(9), pp.1710–1723.

Ninomiya, M., Shirabe, K., Shimada, M., Terashi, T., & Maehara, Y., 2011. Role of UCP2 Expression after Hepatic Warm Ischemia-Reperfusion in the Rat. *Gut and Liver*, 5(4), pp.486–492.

Ozturk, H., Gezici, A., & Ozturk, H., 2006. The effect of celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, on liver ischemia/reperfusion-induced oxidative stress in rats. *Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology*,

34(2), pp.76–83.

Selzner, N., Rudiger, H., Graf, R., & Clavien, P. A., 2003. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology*, 125(3), pp.917–936.

Simmons, D. L., Botting, R. M., & Hla, T., 2004. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological Reviews*, 56(3), pp.387–437.

Tanabe, T., & Tohnai, N., 2002. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 68–69, pp.95–114.

Wang, D. and Dubois, R. N., 2010. Eicosanoids and cancer, *Nat Rev Cancer* 10(3), pp.181–193.

Wang, L., Zhang, S., Cheng, H., Lv, H., Cheng, G., & Ci, X., 2016. Nrf2-mediated liver protection by esculentoside A against acetaminophen toxicity through the AMPK/Akt/GSK3 β pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 101(6), pp.401–412.

Xiao, C.-Y., Yuhki, K., Hara, A., Fujino, T., Kuriyama, S., Yamada, T., Takayama, K., Takahata, O., Karibe, H., Taniguchi, T., Narumiya, S., & Ushikubi, F., 2004. Prostaglandin E₂ protects the heart from ischemia-reperfusion injury via its receptor subtype EP₄. *Circulation*, 109(20), pp.2462–2468.

Yin, H., Cheng, L., Langenbach, R., & Ju, C., 2007. Prostaglandin I₂ and E₂ mediate the protective effects of cyclooxygenase-2 in a mouse model of immune-mediated liver injury. *Hepatology*, 45(1), pp.159–169.