

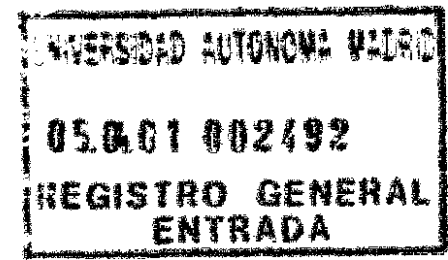
1010/2192

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR**

**ESTUDIO DEL PATRON DE EXPRESION INTRAHEPATICO DE LA  
ENZIMA SINTASA INDUCIBLE DEL OXIDO NITRICO EN LAS  
HEPATITIS CRONICAS VIRICAS. CARACTERIZACION DE  
MECANISMOS REGULADORES DE SU EXPRESION GENICA**

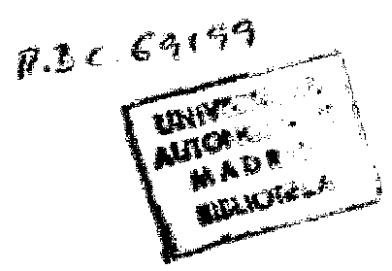
**Memoria para optar al grado de Doctor en  
Ciencias Biológicas que presenta el Licenciado**

**Pedro Lorenzo Majano Rodríguez**



**Directores: Ricardo Moreno Otero**

**Carmelo García Monzón**



**Madrid 2001**

**a mis padres y a mi hermano**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar me gustaría agradecer a Ricardo y Carmelo el que me brindaran la posibilidad de realizar la tesis doctoral en la Unidad de Hepatología donde aprender, divertirse y conocer mundo nunca estuvieron refidos. Además a Elena, Manuel y Enrique por facilitarme la integración en el laboratorio de Biología Molecular y enseñarme, no sin gran esfuerzo, la gran mayoría de las técnicas que he ido aprendiendo durante todos estos años.

Quiero agradecer a todos los compañeros que durante estos años han pasado por la Unidad de Hepatología, Rocha, Marisa, Chelo, Mónica, Itxaso, Arantxa, Paloma, María Jesús, Luis, Jesús y Oreste, el haberme ayudado y soportado. Además recordar a todas las personas que en las Unidades de Biología Molecular y de Investigación, en los Servicios de Digestivo e Inmunología del hospital de la Princesa y los laboratorios Europharma han hecho posible que esté escribiendo estas líneas, en especial a mis buenos amigos Pedro Roda, Juan Serrador y Ana Terrés por los buenos momentos que hemos vivido tanto dentro como fuera del trabajo. Tampoco puedo olvidar ahora los buenos momentos que pasé y continuo pasando junto a aquel grupo de amigos que comenzamos la carrera allá por el año 1986. Ahora comienzo a valorar la insistencia de "el gran Alberto" para que abandonara la idea de dedicar mi vida a la enseñanza de las matemáticas, ¡Gracias Malakay!

Por último, recordar a José María, Matías y Fernando de la Universidad de Navarra, que supieron apoyarme y descubrirme alguna de las realidades que acompañan a la gente que hemos elegido la carrera científica como modo de vida. Tampoco olvidaré al resto de pamplónicas por introducirme en la cultura del "pimiento, vino y chuletón", por desgracia este último en entredicho en estos días, y sobre todo que hacerme ver que Madrid no es ni mucho menos el centro del mundo.

A todos vosotros, que de alguna o muchas maneras me ayudasteis a llegar donde estoy, entero GRACIAS.

## **ABREVIATURAS**

- Acm:** Anticuerpo monoclonal
- Acp:** Anticuerpo policlonal
- AdoMet:** S-Adenosilmetionina
- ADN:** Acido Desoxirribonucleico
- ARN:** Acido Ribonucleico
- ARNm :** Acido Ribonucleico mensajero
- AP-1:** Proteína Activadora [de la transcripción]-1
- AP-2:** Proteína Activadora [de la transcripción]-2
- ATF:** Factor de Transcripción Activador
- C/EBP:** Proteína de Unión al Enhancer CCAAT
- CM:** Mezcla de citocinas proinflamatorias
- CMV:** Citomegalovirus
- CREB:** Proteína de Unión al Elemento de Respuesta a cAMP
- Dex:** Dexametasona
- EGF:** Factor de Crecimiento Epidérmico
- ERK:** Kinasa Regulada por Señal Extracelular
- FAD:** Flavín Adenín Dinucleótido
- FMN:** Flavín Mononucleótido
- GAS:** Secuencias Activadas por Interferón
- GSH:** Glutation
- HBcAg:** Proteína del core del VHB
- HBsAg:** Proteína de superficie del VHB
- HBx:** Proteína x del VHB
- HC:** Hepatitis Crónica
- HCV:** Hepatitis Crónica Vírica.
- HGF:** Factor de Crecimiento de Hepatocitos
- IAH:** Índice de Actividad Histológica
- IFN- $\gamma$ :** Interferón  $\gamma$
- I $\kappa$ B:** Inhibidor  $\kappa$ B
- IRF-1:** Elemento de Respuesta a Interferón-1

- IRN: Intermediarios Reactivos del Nitrógeno**
- IL-1 $\beta$ : Interleucina-1 $\beta$**
- JNK: Quinasa N-terminal de c-Jun**
- LPS: Lipopolisacárido bacteriano**
- LTR: Repetición Terminal Larga**
- MAPK: Proteína Quinasa Activada por Mitógenos**
- MEK: MAPK/ERK Kinasa**
- MMTV: Virus de Tumor Mamario de Ratón**
- NAD: Nicotín Adenín Dinucleótido**
- NADPH: Nicotín Adenín Dinucleótido Fosfato reducido**
- NF-AT: Factor Nuclear de células T Activadas**
- NF- $\kappa$ B: Factor Nuclear  $\kappa$ B**
- NLS: Secuencia de Localización Celular**
- NS: Proteína No estructural del VHC**
- NT: Nitrotirosinas**
- ON: Oxido Nítrico**
- ONS: Sintasa del Oxido Nítrico**
- ONS<sub>e</sub>: Sintasa del Oxido Nítrico endotelial**
- ONS<sub>i</sub>: Sintasa del Oxido Nítrico inducible**
- ONS<sub>n</sub>: Sintasa del Oxido neuronal**
- PKC: Proteín Quinasa C**
- RPB5: Subunidad 5 de la ARN Polimerasa**
- RSV: Virus de Sarcoma de Rouss**
- SV40: Virus de Simio 40**
- TNF- $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$**
- TGF- $\beta$ : Factor de Crecimiento de Tumores  $\beta$**
- VHB: Virus de la Hepatitis B**
- VHC: Virus de la Hepatitis C**

# INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>6</b>
<b>1. HEPATITIS CRÓNICA VIRICAS.</b>	<b>7</b>
1.1. Descripción.	7
1.2. Clasificación.	8
1.3. Infección crónica por el virus de la hepatitis B.	9
1.3.1. Características.	9
1.3.2. VHB y proteína X del VHB.	10
1.4. Infección crónica por el virus de la hepatitis C.	12
<b>2. OXIDO NITRICO.</b>	<b>13</b>
2.1. Características.	13
2.2. Sintetasas del óxido nítrico. Características y clasificación.	14
2.3. Expresión de las ONS en células hepáticas.	16
2.4. Efectos mediados por el ON; Nitrotirosinas.	17
2.5. Papel del ON en la función hepática.	19
2.6. Regulación de las ONS.	21
2.6.1. Regulación de la ONSi.	21
2.6.2. NF- $\kappa$ B.	22
2.7. Papel del ON en la inflamación crónica.	23
2.8. Papel del ON en la infección viral.	24
<b>3. S-ADENOSILMETIONINA.</b>	<b>25</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>30</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>36</b>
<b>1. Expresión de la ONSi en la HCV.</b>	<b>37</b>
1.1. Patrón intrahepático de expresión de la ONSi en la HCV.	37
1.2. Relación entre el grado de expresión intrahepático de la ONSi y la actividad inflamatoria de la HCV.	40
<b>2. Detección de NT en la HCV.</b>	<b>41</b>
2.1. Acumulación intrahepática de NT en la HCV.	41
2.2. Relación entre el índice inmunohistoquímico de marcaje de NT y la gravedad de la HCV.	44
<b>3. Análisis de factores que modulan la expresión de la ONSi en líneas celulares derivadas de hepatocitos humanos.</b>	<b>45</b>
3.1. Expresión de la ONSi en líneas transfectadas establemente con el VHB.	45

3.2. Expresión de la ONSi en líneas transfectadas establemente con la proteína HBx.	46
3.3. Expresión de la ONSi en líneas transfectadas transitoriamente con el VHB y la proteína HBx.	48
3.4. Control de la actividad transcripcional del gen de la ONSi.	49
3.4.1. Efecto de la HBx sobre la transcripción del gen de la ONSi.	49
3.4.2. Efecto de la estimulación con citocinas proinflamatorias sobre la transcripción del gen de la ONSi.	50
3.4.3. Efecto simultáneo de las citocinas proinflamatorias y la proteína HBx sobre la transcripción del gen de la ONSi.	51
3.4.4. Efecto de mutaciones puntuales de sitios NF- $\kappa$ B y AP-1 en la inducción mediada por citocinas proinflamatorias y la HBx sobre la transcripción del gen de la ONSi.	52
3.4.5. Actividad transcripcional del gen de la ONSi en células transfectadas establemente con el VHB y la HBx.	54
3.4.6. Efectos de la localización subcelular de la HBx sobre la transcripción del gen de la ONSi.	55
3.5. Efecto de la HBx y el VHB sobre la actividad de NF- $\kappa$ B.	56
<b>4. Modulación de la expresión de la ONSi por la AdoMet.</b>	<b>59</b>
4.1. Efecto de la AdoMet sobre la expresión hepática de la ONSi en ratas tratadas con lipopolisacárido bacteriano.	59
4.2. Efecto de la AdoMet sobre la expresión de la ONSi en hepatocitos de rata.	60
4.2.1. Efecto sobre los niveles de ARNm y proteínas de la ONSi.	60
4.2.2. Efecto sobre la actividad de NF- $\kappa$ B.	61
4.2.3. Efecto de AdoMet sobre los niveles de proteína de los inhibidores de NF- $\kappa$ B I $\kappa$ B $\alpha$ y I $\kappa$ B $\beta$ .	62
4.3. Efecto de la AdoMet sobre la expresión de la ONSi en líneas celulares derivadas de hepatocitos humanos.	63
<b>DISCUSION</b>	<b>66</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>78</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>80</b>
<b>PUBLICACIONES</b>	<b>100</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>103</b>

## RESUMEN

Las hepatitis crónicas víricas (HCV) son enfermedades hepáticas que evolucionan, en una gran proporción de casos, hacia el desarrollo de lesiones irreversibles como la cirrosis y el hepatocarcinoma. Aunque los factores responsables de la cronicación de la infección y de la progresión del daño hepático no han sido totalmente definidos, se piensa que están implicados tanto factores víricos como celulares.

El óxido nítrico (ON) participa en el control de funciones celulares esenciales como el mantenimiento del tono vascular, la neurotransmisión y el control de infecciones. Sin embargo, también puede influir en el establecimiento y promoción de procesos inflamatorios y carcinogénicos; en estas situaciones, el ON es generado fundamentalmente por la sintasa inducible del óxido nítrico (ONSi), capaz de generar grandes cantidades de ON durante períodos de tiempo prolongados. La modulación de la expresión y la actividad de las distintas isoformas de la ONS y en particular de la ONSi está considerada como una estrategia con un gran potencial terapéutico.

En este trabajo se demuestra la existencia de un incremento en la expresión hepática de la ONSi en biopsias de pacientes con HCV. Además, en estas mismas patologías, hemos detectado un incremento en la acumulación tisular de nitrotirosina, marcador de la interacción de peroxinitrito con proteínas celulares, la cual estaba significativamente relacionada con la intensidad del daño hepático. Adicionalmente, hemos establecido la participación del virus de la hepatitis B y, más concretamente, de la proteína X de este virus, en la inducción a nivel transcripcional del gen de la ONSi a través de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

La S-adenosilmetionina (AdoMet) ha sido utilizada eficazmente en el tratamiento de distintas patologías hepáticas, sin embargo los mecanismos a través de los cuales actúa no son totalmente conocidos. En este trabajo hemos demostrado que la AdoMet es capaz de inhibir la inducción de la ONSi en el hígado de ratas tratadas con lipopolisacárido bacteriano, así como la mediada por citocinas proinflamatorias en hepatocitos de rata y en líneas celulares derivadas de hepatocitos humanos. Nuestros resultados sugieren que este efecto podría estar mediado, al menos parcialmente, a través de la capacidad de la AdoMet de modular la actividad del NF- $\kappa$ B. Estos datos refuerzan la indicación de la utilización de la AdoMet en el tratamiento de las hepatopatías en las que la generación de ON o la actividad del NF- $\kappa$ B juegan un papel patogénico determinante.



**INTRODUCCION**

## **INTRODUCCION.**

### **I. HEPATITIS CRONICA VIRICA.**

#### **I.1. DESCRIPCION.**

La hepatitis crónica (HC) se define como un proceso inflamatorio hepático que persiste durante al menos un período de 6 meses (Geall y cols., 1968; Boyer, 1976). Esta definición está basada en un criterio arbitrario que, sin embargo, permite excluir de este grupo a pacientes en la fase de infección aguda. Aunque los agentes causantes de las HC pueden ser muy diversos, incluyendo distintos virus, algunos fármacos y procesos autoinmunes, en el presente trabajo se estudiarán aspectos relativos a la HC de etiología vírica (HCV) y más concretamente, a las producidas por el virus de la hepatitis B (VHB) y por el virus de la hepatitis C (VHC).

La HCV se caracteriza, desde un punto de vista histopatológico, por la existencia en el hígado de estos pacientes de diferentes grados de necrosis hepatocelular, inflamación y fibrosis. En los casos de menor intensidad se observa necrosis focal afectando a células individuales o en pequeños focos, apareciendo grupos de células necróticas agrupadas en rosetas en los casos más severos. Los espacios portales hepáticos están expandidos por la presencia de un infiltrado inflamatorio crónico compuesto principalmente por linfocitos T. La intensidad de la HCV aumenta cuando el infiltrado inflamatorio sale del espacio porta e invade el parénquima hepático circundante, provocando cambios en la zona limitante y necrosis parcelar periférica. En estas patologías la colestasis es rara, aunque pueden observarse alteraciones en los conductos biliares, especialmente en pacientes infectados por el VHC, y depósitos de grasa intrahepáticos (hígado graso o esteatosis). Finalmente, las formas avanzadas de HCV se caracterizan por la aparición de fibrosis, que puede evolucionar hacia la formación de puentes fibróticos entre los espacios porta y las venas centrolobulillares limitando los nódulos de regeneración típicos de la cirrosis hepática (Desmet y cols., 1994; Moreno-Otero y cols., 1996; Sherlock y Dooley, 1998).

## 1.2. CLASIFICACION.

La antigua clasificación morfológica que dividía las HC en persistentes, activas y lobulillares ha sido reemplazada por una nueva basada en la etiología y en la gravedad histológica (Czaja, 1993; Desmet y cols., 1994). Desde el punto de vista etiológico los tres tipos principales de HC están asociados a la infección por el VHB, por el VHC y a un proceso de autorreactividad que origina la hepatitis autoinmune, caracterizada por la positividad de autoanticuerpos en el suero. En la tabla A se detallan algunas características de la HC por VHB y VHC.

Tabla A. Clasificación y características de las HCV (Sherlock y Dooley, 1998).

Tipo	Virus/ Genoma	Origen	Transmisión	Patogenicidad	Tratamiento
B	Hepadnavirus ADN	Sangre Hemoderivados Fluidos corporales	Sanguínea Sexual Nosocomial	Cronificación 10% Cirrosis 30% Hepatocarcinoma	Interferón $\alpha$ Lamivudina
C	Flavivirus ARN	Sangre Hemoderivados ¿Fluidos corporales?	Sanguínea ¿Nosocomial?	Cronificación 80% Cirrosis 20% Hepatocarcinoma	Interferón $\alpha$ + Ribavirina

Las HCV habitualmente son asintomáticas y no está demostrado que la gravedad clínica se relacione con los niveles séricos de transaminasas. Finalmente, la valoración histológica está basada en la intensidad del proceso necroinflamatorio (grado) y de la fibrosis (estadio). El método más utilizado para su determinación es el índice de actividad histológica (IAH) de Knodell (Knodell y cols., 1981; Tabla B), donde se incluyen tres componentes de la lesión hepática (necrosis periportal, degeneración intralobular y necrosis focal e inflamación portal) que definen el grado hepático, aparte de la cuantía de la fibrosis que determina el estadio fibrótico.

**Tabla B.** Parámetros para establecer el IAH, excluyendo fibrosis, y clasificar la gravedad histológica de las HC (Knodel y cols., 1981).

Componente	Valoración	Valor IAH	Diagnóstico
Necrosis portal/periportal con o sin puentes necróticos	0-10	1-3	Mínima
		4-8	Leve
Degeneración intralobular y necrosis focal	0-4	9-12	Moderada
		13-18	Intensa
Inflamación portal	0-4		

Otro índice histológico de clasificación de las HCV, propuesto por Scheuer en función de la actividad necroinflamatoria, también es muy utilizado para evaluar la gravedad de las HC (Scheuer, 1991; Tabla C).

**Tabla C.** Clasificación de las HC en función de la actividad necroinflamatoria (Scheuer, 1991).

Grado	Actividad portal/periportal	Actividad lobulillar
0	Ninguna o mínima	Ninguna
1	Inflamación portal	Inflamación sin necrosis
2	Necrosis periportal leve	Necrosis focal
3	Necrosis periportal moderada	Daño celular focal intenso
4	Necrosis periportal intensa	Puentes necróticos

### 1.3. INFECCION CRONICA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B.

#### 1.3.1. Características.

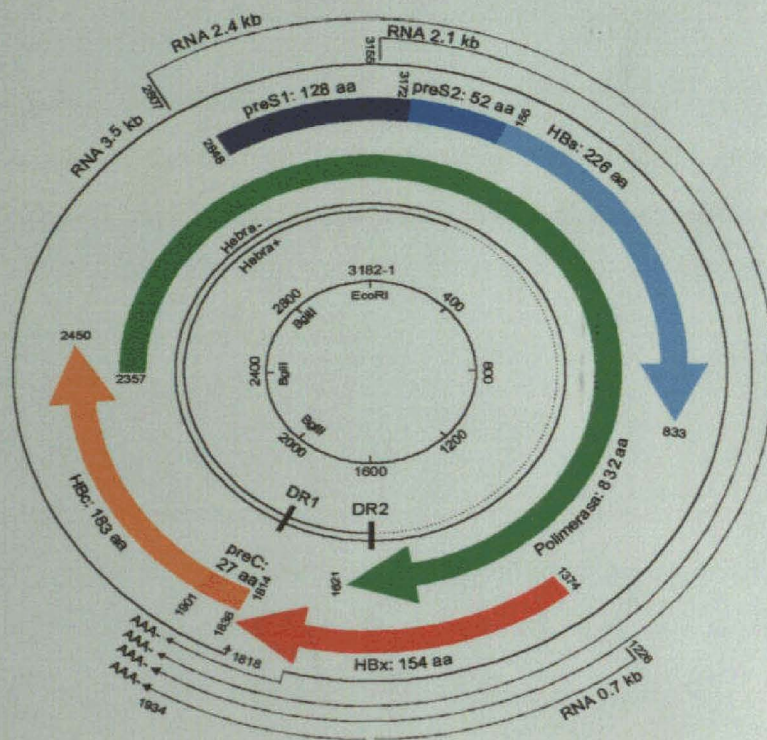
La infección por el VHB afecta a unos 350 millones de personas en el mundo (Chisari, 2000) y es una de las principales causas asociadas al desarrollo de HC, cirrosis y hepatocarcinoma (Feitelson, 1992; Schafer y Sorrell, 1999). En una gran mayoría de casos el proceso crónico no se encuentra precedido por un episodio agudo. Se cree que el VHB no es directamente citopático y que la lisis de los hepatocitos infectados estaría mediada por la respuesta inmune

del huésped, principalmente a través del reconocimiento de células infectadas por parte de los linfocitos T citotóxicos. Sin embargo, cuando la respuesta inmune humoral y celular es insuficiente para eliminar el virus, los pacientes desarrollan HC. Otras posibles explicaciones de la cronicación de la infección radicarían en la existencia de replicación del VHB en tejidos extrahepáticos que actuarían como reservorios víricos, la inhibición o disminución de la presentación de antígenos víricos en los hepatocitos, la existencia de un estado de inmunosupresión, o la aparición de mutaciones del virus (Chisari y Ferrari, 1995; Chisari, 2000).

Distintas citocinas denominadas proinflamatorias, como el interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), se encuentran sobre-expresadas en la HCV (Tilg y cols., 1992). A pesar de que estas citocinas son producidas principalmente por macrófagos y linfocitos T activados, los propios hepatocitos son capaces de generar algunas de ellas, como el TNF- $\alpha$ , según se ha demostrado en biopsias de pacientes con HCV (González-Amaro y cols., 1994). Además, se ha descrito que el VHB puede estar directamente implicado en la sobreexpresión de TNF- $\alpha$  (Lara-Pezzi y cols., 1998a). Aunque este aumento en la producción intrahepática de citocinas puede ser un reflejo inespecífico del proceso inflamatorio, existe una creciente evidencia experimental que implica a estas moléculas en la eliminación del virus sin provocar la lisis de los hepatocitos infectados (Chisari y Ferrari, 1995; Chisari, 2000).

### 1.3.2. VHB y Proteína X del VHB (HBx).

El VHB es un virus hepatotropo perteneciente a la familia de los Hepadnaviridae. Su genoma, uno de los más pequeños conocidos, está compuesto por una doble cadena parcial de ADN y contiene únicamente cuatro marcos abiertos de lectura; dos de ellos codifican para proteínas estructurales, conocidas como antígeno de superficie (HBsAg) y del core (HBcAg), el tercero codifica para la ADN polimerasa vírica y el cuarto, bastante conservado entre todos los hepadnavirus de mamíferos, codifica para la denominada proteína X (HBx) (Miller y cols., 1989). Esta proteína, de 154 aminoácidos y un peso molecular de 17 Kd, debe su nombre al hecho de que cuando fue descubierta no presentaba homología alguna con ninguna de las proteínas conocidas hasta entonces (Benedict, 1996; Murakami, 1999).



**Figura A.** Esquema del genoma del VHB. El genoma, compuesto por un ADN circular de doble cadena parcial, contiene cuatro marcos de lectura solapados: S/preS, C/preC, P y X. El gen S/preS codifica para las tres isoformas del antígeno de superficie HBsAg (grande, mediana y pequeña); el gen C/preC codifica para la proteína de la nucleocápsida viral, proteína core o HBcAg; el gen P codifica para la polimerasa viral y finalmente el gen X codifica para la HBx. DR1 y DR2 representan los sitios más frecuentes por donde se produce la integración vírica en el genoma del huésped.

Durante la infección por el VHB la expresión de la HBx es baja y está relacionada directamente con el nivel de replicación viral; sin embargo, tras la integración del genoma viral el gen de la HBx pierde su regulación y su detección se hace más factible (Feitelson y Duan, 1997). Sin embargo, a pesar de haberse detectado la presencia de la HBx tanto en el suero como en el tejido hepático de individuos con HC y hepatocarcinoma por VHB (Su y cols., 1998), distintos estudios han puesto de manifiesto que es una proteína difícil de detectar debido tanto a su bajo nivel de expresión como a su vida media corta. En este sentido se ha descrito que HBx es capaz de interactuar con una subunidad del proteosoma 26S, lo que favorecería su rápida degradación (Huang y cols., 1996; Hu y cols., 1999).

HBx tiene la capacidad de modificar la expresión de un gran número de genes, principalmente induciendo la expresión de los mismos, a través de mecanismos que no son totalmente conocidos. Esta proteína es capaz de activar la transcripción, tanto de promotores víricos (incluyendo los "enhancers" del propio VHB y del LTR del virus de la inmunodeficiencia humana) como celulares. La capacidad de la HBx de activar la expresión de protooncógenes, como c-fos, c-jun y c-myc, y de alterar el crecimiento de células immortalizadas "in vitro" sugiere que podría estar implicada en la transformación de hepatocitos humanos y en el desarrollo de hepatocarcinoma (Koike, 1995; Cromlish, 1996; Feitelson y Duan, 1997).

Recientemente, se ha relacionado a la HBx con la adquisición de un fenotipo metastásico en líneas derivadas de hepatocitos humanos (Lara-Pezzi y cols., 2001, en prensa). Aunque la HBx no tiene capacidad para unirse directamente al ADN celular es capaz de activar un gran número de factores de transcripción como AP-1 (Tsu y cols., 1993; Natoli y cols., 1994), AP-2 (Seto y cols., 1990), NF- $\kappa$ B (Lucito y Schneider, 1992; Su y Schneider 1996), C/EBP (Mahe y cols., 1991) y NF-AT (Lara-Pezzi y cols., 1998b) entre otros. Además es capaz de interactuar con elementos de la maquinaria basal de transcripción, incluyendo RPB5, una subunidad de las tres ARN polimerasas de mamíferos (Cheong y cols., 1995), y algunos factores de transcripción como ATF/CREB (Maguire y cols., 1991), mimetizando la función celular de estos coactivadores. Otro mecanismo propuesto implica a la proteína HBx en la activación de múltiples rutas de transducción de señales como Ras/Raf/ERK y MEK-1/JNK, a través de las cuales se activan distintos factores de transcripción como AP-1 y NF- $\kappa$ B (Benn y Schneider, 1994; Chirillo y cols., 1996).

La localización subcelular de la HBx es controvertida ya que, aunque se localiza preferentemente en el citoplasma, una pequeña fracción puede ser detectada en el núcleo (Sirma y cols., 1998). La distinta ubicación también parece condicionar la actividad de modo que cuando se encuentra en el citoplasma es capaz de activar factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP-1, mientras que en el núcleo actúa como coactivador interactuando con elementos de la maquinaria basal de transcripción (Doria y cols., 1995). Recientemente se ha descrito que la HBx puede localizarse en la membrana mitocondrial, donde se especula que podría alterar el potencial de la membrana mitocondrial (Rahmani y cols., 2000) y provocar una movilización intracelular de calcio (Takada y cols., 1999).

#### 1.4. INFECCION CRONICA POR EL VHC.

Se estima que el 3% de la población mundial está infectada por el VHC y que este virus es responsable de aproximadamente el 20% de los casos de hepatitis aguda y el 70% de las HC. Hasta el 80% de las infecciones agudas por el VHC evolucionan a la cronicidad, pudiendo seguir un curso relativamente benigno o progresar a cirrosis hepática en el 20-30% de los casos (Alter, 1995; Hoofnagle, 1997; Marcellin, 1999). Además, como en el caso de la hepatitis B, la infección crónica por el VHC está asociada estrechamente a la aparición de hepatocarcinoma (Saito, 1990).

El VHC fue identificado en 1989 (Choo y cols., 1989) lo que permitió conocer su secuencia genómica completa. Se trata de un virus de ARN de cadena sencilla, de un tamaño aproximado de 10 kB y polaridad positiva, perteneciente a la familia de los Flaviviridae (Miller y cols., 1990; Houghton y cols., 1996). El genoma contiene un solo fragmento abierto de lectura que codifica para una poliproteína precursora de entre 3010-3033 aminoácidos, que es procesada proteolíticamente generándose al menos 10 proteínas, 4 de las cuales son estructurales (core, E1, E2 y p7) y 6 no estructurales (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b) (Major y Feinstone, 1997; De Francesco, 1999).

Además de las causas comentadas para el VHB, se considera que uno de los principales motivos de la cronicación de la infección está asociado con la alta tasa de mutación del VHC, manifestada con la aparición de cuasiespecies y genotipos con diferentes subtipos (Simmonds, 1999). Además, el hecho de que algunos pacientes presenten picos en la actividad clínica y bioquímica de la enfermedad sugiere que el VHC es capaz de modular negativamente la respuesta inmune (Brechot, 1994; Honda y cols., 1994).

Como en el caso del VHB, tampoco se conoce con exactitud los mecanismos a través de los cuales la infección crónica por el VHC produce daño hepático. Existen evidencias de que distintos mecanismos inmunes están implicados en la patogenia de la HC y, en contraste al VHB, se piensa que el VHC provocaría un daño celular directo (Ferrari y cols., 1999). Sin embargo, debido a que no existen modelos de infección animales o celulares, los mecanismos a través de los cuales el VHC provoca la cronicación y el daño hepático no han sido todavía definitivamente dilucidados.

## **2. OXIDO NITRICO.**

### **2.1. CARACTERISTICAS.**

La importancia del óxido nítrico (ON) como un mediador de procesos fisiopatológicos ha sido demostrada en los últimos 15 años. Sin embargo, ya en 1916 se observó que los mamíferos son capaces de producir óxidos de nitrógeno (Mitchell y cols., 1916), identificándose posteriormente el origen celular de estos compuestos (Stuerli y Marletta, 1985). En 1987 se determinó que el aminoácido L-arginina actúa como precursor en la síntesis de ON (Hibbs y cols., 1987) y que este último era la molécula conocida hasta entonces como "factor relajante derivado de endotelio" (Ignarro y cols., 1987; Palmer y cols., 1987). Desde esta fecha hasta la actualidad se



han multiplicado de manera exponencial el número de publicaciones acerca de la producción, regulación y efectos del ON en mamíferos, y han permitido establecer que esta molécula participa en el control de procesos fisiológicos esenciales como la regulación del tono vascular, la neurotransmisión y la defensa antiinfecciosa (Moncada y cols., 1991 y 93; Nathan, 1992; Schmidt y Walter, 1994).

El ON es una molécula neutra, de pequeño tamaño (30 Da), cuyo carácter lipofílico le permite atravesar las membranas biológicas. La presencia de un electrón desapareado confiere a esta molécula cierta reactividad y se estima que su vida media está comprendida entre 2 y 30 segundos (Stamler y cols., 1992).

## 2.2. SINTASAS DEL OXIDO NITRICO. CARACTERISTICAS/CLASIFICACION.

En los mamíferos, la generación del ON se produce de manera enzimática a través de una reacción que convierte el aminoácido semiesencial L-arginina y oxígeno en citrulina y ON. Las enzimas encargadas de sintetizar el ON se denominan sintasas del óxido nítrico (ONS) (E.C. 1.14.13.39). Los distintos tipos de ONS son homodímeros y cada monómero está formado por dos elementos fusionados, un citocromo y una citocromo reductasa. Poseen propiedades espectrales similares a la familia de enzimas de tipo citocromo P450, aunque con el dato peculiar de incluir la actividad reductasa en el mismo polipéptido. Para sintetizar ON estas enzimas utilizan tres sustratos, arginina, NADPH y O<sub>2</sub>, y requieren cinco cofactores o grupos prostéticos: FAD, FMN, calmodulina, tetrahipterina y grupo hemo. Aunque las distintas isoformas se diferencian en el extremo aminoterminal, presentan una gran homología en la región carboxiterminal (Marletta, 1993 y 94; Nathan y Xie, 1994a; Griffith y Stfuer, 1995; Moncada y cols., 1997).

La nomenclatura de las ONS es confusa ya que inicialmente se basó en los primeros tipos celulares donde se encontraron las distintas isoformas (ONS neuronal, macrofágica y endotelial). Sin embargo, pronto se demostró que podían estar presente en otras estirpes celulares. Por ejemplo, la isoforma endotelial no sólo se localiza en endotelio vascular sino también en plaquetas (Radomsky y cols., 1990 a) y en algunas poblaciones de neuronas en el cerebro (Dinermann y cols., 1994). La isoforma neuronal se encuentra también en el epitelio de la tráquea y los bronquios (Kobzik y cols., 1993) y en el músculo esquelético (Kobzik y cols., 1994). En cuanto a la isoforma inducible se cree que bajo los estímulos adecuados la gran

mayoría de tipos celulares son capaces de expresarla. El criterio clasificador que divide las isoformas en constitutivas e inducibles también es otra simplificación ya que, por ejemplo, durante el ejercicio físico intenso (Sessa y cols., 1994) o el embarazo (Weiner y cols., 1994) la isoforma constitutiva endotelial es inducida y algunos tejidos, como el epitelio bronquial en humanos, expresan constitutivamente la isoforma inducible (Kobzik y cols., 1993). Un intento posterior consistió en el empleo de una notación numérica denominándose tipo 1 a la isoforma descrita inicialmente en neuronas; tipo 2 a la inducible expresada en macrófagos y tipo 3 a la aislada de células endoteliales.

Finalmente, la clonación de los genes que codifican estas proteínas y los requerimientos de calcio para su funcionalidad han llevado a la clasificación actual en tres grupos: ONSnc (isoforma cuya actividad depende de la elevación de la concentración intra-celular de calcio, del tipo descrito en neuronas), ONSi (isoforma cuya actividad es independiente de la elevación intracelular de calcio y del tipo primitivamente descrito en macrófagos), y ONSec (isoforma cuya actividad depende de la elevación de la concentración intracelular de calcio, del tipo descrito en endotelio). Este último criterio será el utilizado para denominar a las distintas ONS a lo largo de esta tesis doctoral. Los tipos ONSnc y ONSec, debido a la transitoriedad de los estímulos que determinan incrementos en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ , producen ON durante períodos de tiempo cortos y en pequeñas cantidades. Sin embargo, la ONSi una vez sintetizada es capaz de generar cantidades mayores de ON y durante períodos de tiempos más prolongados (Moncada y cols., 1997).

**Tabla D.** Clasificación de las ONS (Moncada y cols., 1997).

Denominación Clásica	Denominación Numérica	Localización Cromosómica	Dependencia de $Ca^{2+}$	Tamaño Monómero
Constitutiva/neuronal	ONS 1	12q24.2	Sí	~160 kD
Inducible/macrofágica	ONS 2	17 centr	No	~133 kD
Constitutiva/endotelial	ONS 3	7q35-36	Sí	~130 kD

### 2.3. EXPRESION DE ONS EN CELULAS HEPATICAS.

Las tres isoformas de la ONS se encuentran presentes en el hígado, siendo la ONSec y ONSi las más parecen jugar un papel más importante. La ONSnc aparece restringida a las terminaciones nerviosas de los vasos sanguíneos de mayor tamaño y su papel no está totalmente definido (Esteban y cols., 1997). En la mayoría de los tejidos la ONSec controla el flujo sanguíneo, produciendo ON en respuesta a vasodilatadores provenientes del endotelio y a estímulos físicos como el propio flujo sanguíneo. En el hígado, el control del flujo sanguíneo es regulado de manera distinta a la de otros tejidos debido a la circulación dual que soporta, proveniente tanto de la arteria hepática como de la vena porta (Lautt y Greenway, 1987). A pesar de que la arteria hepática es similar a otras arterias, el sistema portal se acomoda a cualquier flujo, por lo que es difícil pensar que la vasodilatación mediada por ON determine el flujo sanguíneo portal total. Sin embargo, la ONSec ha sido localizada en células del endotelio sinusoidal (Shah y cols., 1997; Rockey y Chung, 1998) y parece controlar el flujo local (Clemens y cols., 1997) y la presión portal (Rockey, 1997; Clemens, 1998).

La ONSi puede expresarse en todos los tipos celulares que se encuentran en el hígado; las células endoteliales (Rockey y Chung, 1996), las células de Kupffer (Billiar y cols., 1989), los hepatocitos (Curran y cols., 1989; Geller y cols., 1993 a,b), las células estrelladas o células de Ito (Helyar y cols., 1994; Rockey y Chung 1995) y los colangiocitos expresan esta isoforma bajo determinadas circunstancias (Geller y cols., 1994; Alarcón y cols., 1997; Clemens, 1999).

Uno de los primeros tipos celulares donde se determinó que podía sintetizarse ON por mediación de la ONSi fueron los macrófagos murinos, en respuesta tanto a lipopolisacárido bacteriano (LPS) (Stuerh y cols., 1985) como a distintos estímulos inflamatorios (Billiar y cols., 1989). Cualquier tipo de infección, ya sea bacteriana, fúngica o vírica puede iniciar el desarrollo de sepsis; sin embargo, este síndrome se desencadena mayoritariamente por la infección de bacterias gram-negativas. El proceso comienza con la proliferación de bacterias en el foco de infección. A continuación los microorganismos pueden invadir el torrente sanguíneo favorecidos por distintos factores, como la disfunción del sistema retículoendotelial o por el aumento de la permeabilidad de las barreras epiteliales, y liberan sustancias tóxicas a la sangre. Estas sustancias activan distintos tipos celulares, como macrófagos, neutrófilos, linfocitos y células endoteliales, que a su vez liberan una serie de mediadores endógenos que inician la cascada de la respuesta inflamatoria (Parrillo, 1993). Entre estos factores se encuentran

distintas citocinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ , implicadas en la inducción de la ONSi en un gran número de tipos celulares. La generación de ON durante el proceso de sepsis también ha sido demostrada en humanos (Ochoa y cols., 1991).

Los hepatocitos también son capaces de producir ON. Estas células expresan la ONSi en respuesta a un medio condicionado proveniente de células de Kupffer estimuladas con LPS e IFN- $\gamma$  (Curran y cols., 1989). Estudios posteriores demostraron que las citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  eran las responsables de la inducción en hepatocitos (Curran y cols., 1990). Experimentos de endotoxemia en ratas han demostrado que los hepatocitos pueden expresar la ONSi in vivo, detectándose el ARNm a partir de las 3 horas y la máxima inducción de la enzima entre las 12-16 horas, tras las cuales los niveles séricos de nitritos y nitratos declinan rápidamente (Pittner y cols., 1992; Geller y cols., 1994).

El hecho de que los hepatocitos humanos puedan expresar la ONSi (Nussler y cols., 1992), facilitó que fueran las primeras células humanas donde se clonó esta isoforma (Geller y cols., 1993 b). En los hepatocitos humanos se necesita una estimulación simultánea con varias citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) para lograr la máxima expresión de la ONSi. Estudios posteriores determinaron que la IL-1 $\beta$  es capaz de inducir la expresión por sí sola, mientras que el TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  cooperan con esta citocina para alcanzar una mayor expresión (Geller y cols., 1995). Otros estímulos como por ejemplo activadores de la proteína quinasa C (PKC) (ésteres de forbol junto con ionóforos de calcio) inducen la expresión de la ONSi en hepatocitos (Hortelano y cols., 1992), mientras que los glucocorticoides (Knowles y cols., 1990; Geller y cols., 1993 a) y mitógenos hepáticos como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de tumores  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) pueden inhibirla (Liu y cols., 1996).

#### **2.4. EFECTOS MEDIADOS POR EL ON: NITROTIROSINAS (NT).**

Un hecho importante a destacar es que, aunque en términos generales se hable de ON, algunas de las funciones atribuidas al mismo están mediadas por intermediarios generados por la interacción del ON con otras moléculas y no por el ON directamente. Recientemente se ha acuñado el término de "intermediarios reactivos del nitrógeno" (IRN) para hacer referencia a distintos estados de oxidación y aductos nitrogenados producidos por la acción de las ONS, incluyendo nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), anión nitrosilo (NO<sup>-</sup>), catión nitrosonio (NO<sup>+</sup>),

$\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}_4$ , S-nitrosotioles y peroxinitrito (OONO-) (Stamler 1992 y 94 a ; Butler y cols., 1995). Los distintos tipos de reacciones químicas en las que participa el ON permiten dividir sus efectos en directos e indirectos; los primeros son producidos directamente por el ON, mientras que los indirectos son consecuencia de la interacción de derivados del ON con moléculas diana. En general se estima que cuando se genera ON en pequeñas cantidades, a través de la activación de las isoformas constitutivas, predominan los efectos directos, mientras que cuando se expresa la ONSi y se generan cantidades mayores de ON, prevalecen los indirectos (Grisham y cols., 1999).

**Efectos directos:** Tiene lugar primordialmente por la interacción del ON con moléculas que poseen átomos de hierro, siendo las más importantes las proteínas que contienen el grupo hemo. Una de estas interacciones tiene lugar con la enzima guanilato ciclasa y provoca la estimulación de la síntesis de GMPc. Esta activación se ha asociado con la regulación del tono vascular, con la inhibición de la agregación plaquetaria y la interacción entre leucocitos y endotelio producidas por el ON (Ignarro, 1990). Otras metaloproteínas con las que el ON pueden interactuar son el citocromo P-450, la citocromo oxidasa, la catalasa y las propias ONS.

El ON es capaz de actuar como antioxidante inhibiendo reacciones de oxidación catalizadas por el hierro que generan radicales libres de oxígeno, como el radical hidroxilo (Kanner y col., 1991). Además, puede interactuar con hemoproteínas, como hemoglobina, mioglobina y ciertos citocromo en estados elevados de oxidación y reducirlos a su estado de oxidación original, y con radicales generados durante la peroxidación lipídica impidiendo así la formación de lípidos con potencial proinflamatorio (Rubbo y cols., 1994). Estas reacciones, que evitan la acumulación de moléculas tóxicas y proinflamatorias, podrían explicar el papel protector ejercido por el ON en modelos de citotoxicidad inducidas por agentes oxidantes. Sin embargo, en determinadas circunstancias los productos generados por la interacción del ON con radicales lipídicos pueden descomponerse y generar radicales con mayor capacidad oxidante (Wink y Mitchell, 1998).

**Efectos indirectos:** Están mediados principalmente por intermediarios generados tras la reacción del ON con  $\text{O}_2$  o  $\text{O}_2^-$ , y se asocian a la fisiopatología de numerosos procesos inflamatorios. Los compuestos con una mayor relevancia fisiológica son el trióxido de nitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) y el peroxinitrito (Wink y Mitchell, 1998).

La autooxidación del ON en solución acuosa tiene como resultado la generación de  $N_2O_3$ , un agente nitrosante muy potente. La interacción del  $N_2O_3$  con distintas moléculas genera nitrosaminas y nitrosotioles, productos con capacidad carcinogénica. Sin embargo, también se ha sugerido que los nitrosotioles formados por la interacción del  $N_2O_3$  y residuos tiólicos juegan un papel importante en el transporte de ON y en la regulación de sistemas de transducción de señales y expresión génica (Stamler, 1994).

El peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), formado por la interacción entre NO y  $O_2^-$ , es un potente oxidante capaz de oxidar residuos tiólicos o tioéteres, degradar carbohidratos, iniciar la peroxidación lipídica y alterar el ADN (Beckmann y cols., 1990 y 1996 a,b). Se ha demostrado que la generación de NO y  $O_2^-$  en cantidades equimoleculares puede dar lugar a la generación de peroxinitrito, sin embargo, cuando el flujo de cualquiera de los dos sustratos excede al otro, la formación se ve notablemente disminuida (Miles y cols., 1996). El peroxinitrito se ha asociado con el daño tisular observado en distintas patologías, incluyendo desórdenes neurodegenerativos, enfermedades cardíacas, inflamación crónica, enfermedades autoinmunes, cáncer y shock séptico entre otros (Groves, 1999). En particular, este potente oxidante provoca la nitración en posición orto de aminoácidos aromáticos y la formación de 3-nitrotirosinas (NT) como producto estable de su interacción con proteínas (Beckmann, 1996 a,b). La presencia de NT ha sido detectada en una gran variedad de procesos patológicos como shock séptico, arterioesclerosis, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica (Groves, 1999).

## 2.5. EFECTOS DEL ON EN LA FUNCION HEPATICA.

Distintas líneas de investigación han puesto de manifiesto que el ON participa activamente en el control de importantes funciones hepáticas (Alarcón y cols., 1998; Clemens, 1999; Li y Billiar, 1999).

El ON es capaz de inhibir la síntesis de proteínas en cultivos de hepatocitos. Cuando estas células son estimuladas con citocinas proinflamatorias (Curran y cols., 1990) o son cultivados junto a células de Kupffer y el sistema es expuesto a LPS (West y cols., 1988), se produce una disminución significativa de la síntesis de proteínas, acompañada de un incremento de los niveles de  $NO_2^-$  y  $NO_3^-$ , que puede ser mimetizada por donadores de ON y revertida con inhibidores de las ONS (Billiar y cols., 1989; Curran y cols., 1991). En ambos

casos la acción parece estar mediada por la ONSi. La inhibición de la síntesis proteica no implica una reducción en la viabilidad de los hepatocitos y no existe un incremento en la liberación de marcadores de daño celular; además parece ser independiente de la síntesis de GMPc (Curran y cols., 1991). Sin embargo, no está claro que la misma inhibición se produzca "in vivo" (Sax y cols., 1988; Frederick y cols., 1993).

El ON también puede alterar el metabolismo de los hidratos de carbono. Moléculas donadoras de ON inhiben tanto la adenilato ciclasa como a la glucogenolisis inducida por glucagón, datos que sugieren que el ON podría regular los niveles de glucemia (Brass y Vetter, 1993). Estos mismos donadores son capaces de inhibir la gluconeogénesis en cultivos de hepatocitos (Horton y cols., 1994), mecanismo que podría explicar la disminución en la gluconeogénesis en modelos animales de sepsis. Además, en estos modelos se ha observado una inhibición de la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de ON (Molina y cols., 1992). Sin embargo, en un modelo de sepsis en ratones que carecen del gen de la ONSi se observó una reducción de los niveles de gluconeogénesis similar al detectado en animales con fenotipo salvaje, por lo que el papel del ON en el control de la gluconeogénesis no está totalmente definido (Ou y cols., 1996).

La capacidad del hígado para metabolizar un gran número de drogas y toxinas depende de un grupo de proteínas de la familia del citocromo P450 (Ghezzi y cols., 1986). Las citocinas implicadas en la inducción de la ONSi en hepatocitos son capaces de inhibir esta enzima e inhibidores de la síntesis de ON revierten este efecto en hepatocitos de ratas estimuladas con LPS (Stadler y cols., 1994). Esta capacidad del ON para alterar este sistema enzimático podría explicar, al menos parcialmente, el deficiente metabolismo de ciertos fármacos que caracteriza a los procesos inflamatorios.

El ON afecta también a la respiración mitocondrial a través de la interacción con el grupo hemo de los citocromos, provocando así una disminución en la actividad respiratoria y el metabolismo de los hepatocitos (Kurose y cols., 1993; Guilivi y cols., 1998). Sin embargo, no está claro que este hecho contribuya al daño hepático.

Otro proceso influenciado por el ON es la apoptosis. La generación de grandes cantidades de ON induce apoptosis afectando a la permeabilidad mitocondrial y provocando la liberación de citocromo C (Packer y Murphy 1994; Costantini y cols., 1995; Balakirev y cols.,

1997; Hortelano y cols., 1997) o dañando el ADN con la consiguiente activación de la enzima poli ADP-ribosa sintasa, que consume grandes cantidades de NAD y provoca depresión metabólica (Szabo, 1996, Szabo y Ohshima, 1997). Ambos efectos parecen estar mediados principalmente por el peroxinitrito. En estos procesos la generación de radicales libres de oxígeno parece jugar un papel importante, ya que la reducción de los sistemas antioxidantes celulares incrementa la apoptosis asociada al ON. Paradójicamente, el ON es capaz de inhibir la apoptosis en hepatocitos a través de una inhibición de la actividad del sistema de las caspasas, efecto que parece estar mediado a través de la S-nitrosilación de estas proteínas (Kim y cols., 1997a y 2000, Li y cols., 1999). En este sentido es de destacar que la proteína p53, capaz de inducir apoptosis en células con daños a nivel del ADN, inhibe la expresión de la ONSi (Ambs y cols., 1998). Además, el ON también podría inhibir la apoptosis mediada por TNF- $\alpha$  a través de la inducción de la proteína de choque térmico 70 (Kim y cols., 1997b). Estos efectos antagónicos mediados por el ON parecen depender en gran medida de la cantidad de ON generado, la localización subcelular donde es generado, así como del estado de óxido-reducción celular y el tipo celular analizado.

## **2.6. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS ONS.**

Debido al gran número de procesos fisiológicos y fisiopatológicos controlados por el ON no es extraño que tanto la expresión como la actividad de las ONS y en particular de la ONSi, sean procesos estrechamente controlados (Morris y Billiar 1995; Taylor y cols., 1998a; Geller y cols., 1998; Taylor y Geller, 2000; Rao, 2000).

### **2.6.1. Regulación de la expresión de la ONSi.**

Uno de los principales puntos de control en la expresión de la ONSi se ejerce a nivel transcripcional. La importancia del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en la inducción de la transcripción del gen de la ONSi se determinó en un primer momento en macrófagos murinos en respuesta a LPS e IFN- $\gamma$  (Nathan y Xie, 1994). El fragmento de 1,7 kB del promotor proximal del gen de la ONSi murina contiene elementos funcionales de respuesta a citocinas y LPS, incluyendo dos sitios NF- $\kappa$ B, elementos de respuesta a interferón (IRF-1), secuencias activadas por interferón (GAS) y de respuesta a hipoxia entre otros. En particular, los sitios NF- $\kappa$ B -85 proximal y -974 distal en el promotor murino son importantes en la inducción mediada por LPS en células RAW 264.7 (Lowenstein 1993; Xie y cols., 1993). Sin embargo,



los resultados derivados del estudio del promotor humano revelaron una gran discrepancia con los resultados obtenidos en ratones. A pesar de la existencia de una elevada homología en la región promotora proximal del gen de la ONSi entre estas dos especies, estudios realizados en células derivadas de hepatocitos humanos demostraron que los elementos que confieren la inducibilidad por citocinas proinflamatorias se encuentran localizados en un fragmento de la región promotora de mucho mayor tamaño (De Vera y cols., 1996). Estudios posteriores permitieron la localización concreta de estos elementos, implicándose además a los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1 (Taylor y cols., 1998b; Marks-Konczalik y cols., 1998).

Además de la regulación a nivel transcripcional, la regulación post-transcripcional parece ser importante en el control de la expresión de la ONSi. La región 3' no traducida del ARNm de la ONSi contiene secuencias desestabilizadoras (Geller y cols., 1993), encontradas también en protooncogenes, factores de transcripción y citocinas (Shaw y Kamen, 1986, Caput y cols., 1986), que parecen importantes en su estabilidad (Rodríguez-Pascual y cols., 2000). Además, como el resto de las isoformas, la ONSi está sujeta a modificaciones post-traduccionales que influyen en la estabilidad de la proteína, dimerización, localización subcelular y en la unión de cofactores. Por otra parte, la funcionalidad de las ONS puede ser controlada a través de la disponibilidad de sustratos o por el mismo ON (Michel y Feron, 1997; Geller y Billiar, 1998; Rao, 2000; Mori y Gotoh, 2000).

### 2.6.2. NF- $\kappa$ B.

Con este nombre se designa a un grupo de proteínas ubicuas, preexistentes en el citoplasma de células en reposo, que juegan un papel primordial en la respuesta celular frente a situaciones de estrés o proinflamatorias y en la regulación de la respuesta inmune (Bauerle y cols., 1994). La familia de factores nucleares Rel/NF- $\kappa$ B está compuesta por cinco miembros: p105 y p100, que dan lugar mediante un proceso de rotura proteolítica a las proteínas p50 y p52 respectivamente y p65 (Rel-A), Rel B y c-Rel, sintetizadas como proteínas maduras (Nabel y cols., 1993; Gosh y cols., 1998). Estos factores forman complejos homo o heterodiméricos, compuestos por distintas combinaciones de los miembros de esta familia, que difieren entre sí en su capacidad de unión a ADN, potencial de transactivación y en los niveles de expresión en los distintos tejidos (Grilli y cols., 1993; Siebenlist y cols., 1994; Gosh y cols., 1998).

En células no estimuladas, el NF- $\kappa$ B se encuentra en el citoplasma formando complejos con proteínas inhibidoras, de modo que su secuencia de localización nuclear permanece oculta. Existen dos tipos de complejos, el primero formado por miembros de la familia NF- $\kappa$ B y miembros de la familia de proteínas inhibidoras  $\kappa$ B (I $\kappa$ B  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  y Bel 3), y el segundo por las formas no procesadas de p50 y p52 unidas a RelA/p65, Rel B o c-Rel. (Beg y cols., 1993; Ghost y cols., 1998). La activación y translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B conlleva la fosforilación, ubiquitinización y posterior degradación por el proteosoma de las proteínas inhibidoras I $\kappa$ B (Traenckner y cols., 1995; Chen y cols., 1995). Los estímulos que provocan la activación de NF- $\kappa$ B son muy diversos y entre ellos se encuentran citocinas, mitógenos, componentes de bacterias y virus, estrés físico y oxidativo, y agentes químicos (Grilli, 1993; Baldwin, 1996; Ghost y cols., 1998). Básicamente, todos los estímulos estudiados que determinan su activación lo hacen mediante un incremento de los niveles intracelulares de radicales libres de oxígeno y son sensibles a antioxidantes como N-acetilcisteína o ditiocarbamatos, por lo que NF- $\kappa$ B es considerado como un factor de transcripción de respuesta a estrés oxidativo (Schreck y cols., 1991 y 92). Otro grupo de inhibidores actúa interfiriendo con la degradación o induciendo la síntesis de las I $\kappa$ B (Beyaert y cols., 1996; Griscavage y cols., 1996; Heck y cols., 1997; Hehner y cols., 1998).

## **2.7. PAPEL DEL ON EN LA INFLAMACIÓN CRÓNICA.**

El ON está considerado como uno de los principales mediadores del proceso inflamatorio (Nussler y Billiar, 1993). Sin embargo, debido a la naturaleza de esta molécula le han sido atribuidas tanto propiedades pro- como antiinflamatorias. Distintas líneas de experimentación han demostrado que las propiedades antiinflamatorias del ON están asociadas básicamente a procesos de inflamación aguda. En estas circunstancias, se estima que son las isoformas constitutivas las responsables de la síntesis de ON, generándose ON en pequeñas cantidades y, lo que parece más importante, durante cortos períodos de tiempo. Entre las propiedades regulatorias-antiinflamatorias atribuidas al ON se encuentran el mantenimiento del tono vascular, la protección de la integridad de las mucosas, la actividad antioxidante y la inhibición de procesos como la migración y proliferación de células de músculo liso, la adhesión de células inflamatorias a endotelio y la agregación plaquetaria (Grisham y cols., 1999; Miller y Sandoval 1999; Zamora y cols., 2000).

Sin embargo, durante los procesos inflamatorios crónicos el ON, generado fundamentalmente por la ONSi, posee sobre todo propiedades proinflamatorias (Grisham y cols., 1999; Miller y Sandoval, 1999; Zamora y cols., 2000). La participación de ON en la patogenia de enfermedades inflamatorias crónicas como artritis, hepatitis, enfermedad inflamatoria intestinal, y enfermedades autoinmunes ha sido ampliamente demostrada (Loscalzo, 1995; Nathan, 1997; Grisham, 1994; Hierholzer y cols., 1998; Palombella y cols., 1998); en estas patologías se cree que son los IRN, y no el ON directamente, los que mediarían los efectos deletéreos, por lo que la inhibición de la generación de ON parece tener consecuencias beneficiosas

## 2.8. PAPEL DEL ON EN LA INFECCION VIRICA.

El ON ha sido implicado en el control de la infección frente a una gran variedad de agentes patógenos incluyendo bacterias, protozoos, helmintos y virus. La toxicidad ejercida sobre los distintos agentes patógenos está asociada muy frecuentemente a una elevada y sostenida generación de ON a través de la ONSi (Vouldoukis y cols., 1995; Fang, 1997; Reiss y Komatsu, 1998; Nathan y Shiloh, 2000).

Numerosos trabajos han demostrado que el ON es capaz de inhibir la replicación de gran variedad de virus; la lista incluye tanto virus de ADN y ARN, desnudos y encapsulados, como picornavirus, virus de la encefalitis japonesa, de la hepatitis de ratones, de la estomatitis vesicular, herpes simple y vaccinia virus entre otros. Sin embargo, existen algunas excepciones como por ejemplo el virus influenza, por lo que aunque el espectro de inhibición del ON es amplio no es universal (Reiss y Komatsu, 1998). El gran número de virus cuya replicación es afectada por el ON sugiere que los mecanismos a través de los cuales el ON ejerce esta acción antivírica son muy diversos; por ejemplo, en el caso del coxsackievirus tipo B3 la síntesis de ARN y proteínas víricas están inhibidas (Zaragoza y cols., 1997) mientras que en el virus vaccinia lo están la síntesis de proteínas tardías y la replicación de ADN (Harris y cols., 1995; Melkova y Esteban, 1995). Sin embargo, también existen infecciones víricas donde la producción de ON tiene efectos deletéreos y está directamente asociada con el daño tisular observado en estas patologías (Akaike y cols., 1996; Lowenstein y cols., 1996; Grzybicki y cols., 1997). Además se ha propuesto que la asociación entre la infección vírica y el desarrollo de procesos carcinogénicos podría estar mediada, al menos parcialmente, por la producción de ON (Ohshima y Bartsch, 1994; Tamir y Tannenbaum, 1996).

### **3. S-ADENOSILMETIONINA.**

En los mamíferos la S-adenosilmetionina (AdoMet) se sintetiza de manera enzimática a partir del aminoácido esencial L-metionina. El metabolismo hepático de la metionina comprende dos reacciones secuenciales, el ciclo de la metionina y la ruta de transulfuración (Figura C), y tiene una importancia vital ya que participa en tres de las principales funciones celulares; por un lado, proporciona a la célula la AdoMet necesaria para la síntesis de poliaminas y la metilación de numerosos constituyentes celulares (ADN, fosfolípidos, proteínas, etc.), además está ligado a la única vía de regeneración de tetrahidrofolato, necesario para la síntesis de ADN y ARN, y por último, en el hígado el ciclo de la metionina está conectado también a la ruta de transulfuración, que proporciona glutatión (GSH), uno de los principales antioxidantes celulares (Finkelstein, 1990; Mato y cols., 1994 y 1997)

La AdoMet es sintetizada en una reacción catalizada por la metionina adenosiltransferasa (MAT) (EC 2.5.1.6) a partir de metionina y ATP. Por acción de esta enzima la porción adenosilo de la molécula de ATP es transferida a la metionina formando un ión sulfonio, el cual se comporta como un reactivo de alta energía cediendo el grupo metilo a una gran variedad de aceptores. En los mamíferos se han encontrado tres isoformas de MAT denominadas I, II y III; Las isoformas I y III se encuentran en el hígado adulto y la II se encuentra en hígado fetal, riñón, cerebro, testículos y en menor medida en el hígado adulto (Motb y Geller 1993; Mato y cols., 1994 y 97).

La disponibilidad de AdoMet tiene importantes efectos reguladores sobre el crecimiento, la diferenciación y la función de distintos tipos celulares (Aletta y cols., 1998), ya que las reacciones de metilación dependiente de esta molécula están implicadas en la regulación de funciones celulares básicas como el control de la fluidez de membrana, la transmisión de señales y la expresión génica (Chiang y cols., 1996).

Todos los tejidos tienen capacidad para sintetizar y utilizar AdoMet. Sin embargo, la actividad específica de la MAT varía mucho entre tejidos y es máxima en el hígado, hecho que hace que este órgano sea el principal productor de GSH del organismo y desde donde se transporta a otros tejidos. El GSH juega un papel relevante en funciones celulares esenciales como las reacciones de detoxificación, de mantenimiento de la funcionalidad de proteínas y otras moléculas, de protección frente a radicales libres y agentes oxidantes y de modulación de

procesos celulares esenciales como la síntesis de ADN, la proliferación y la respuesta inmune (Meister, 1988; DeLeve y Kaplowitz, 1991).

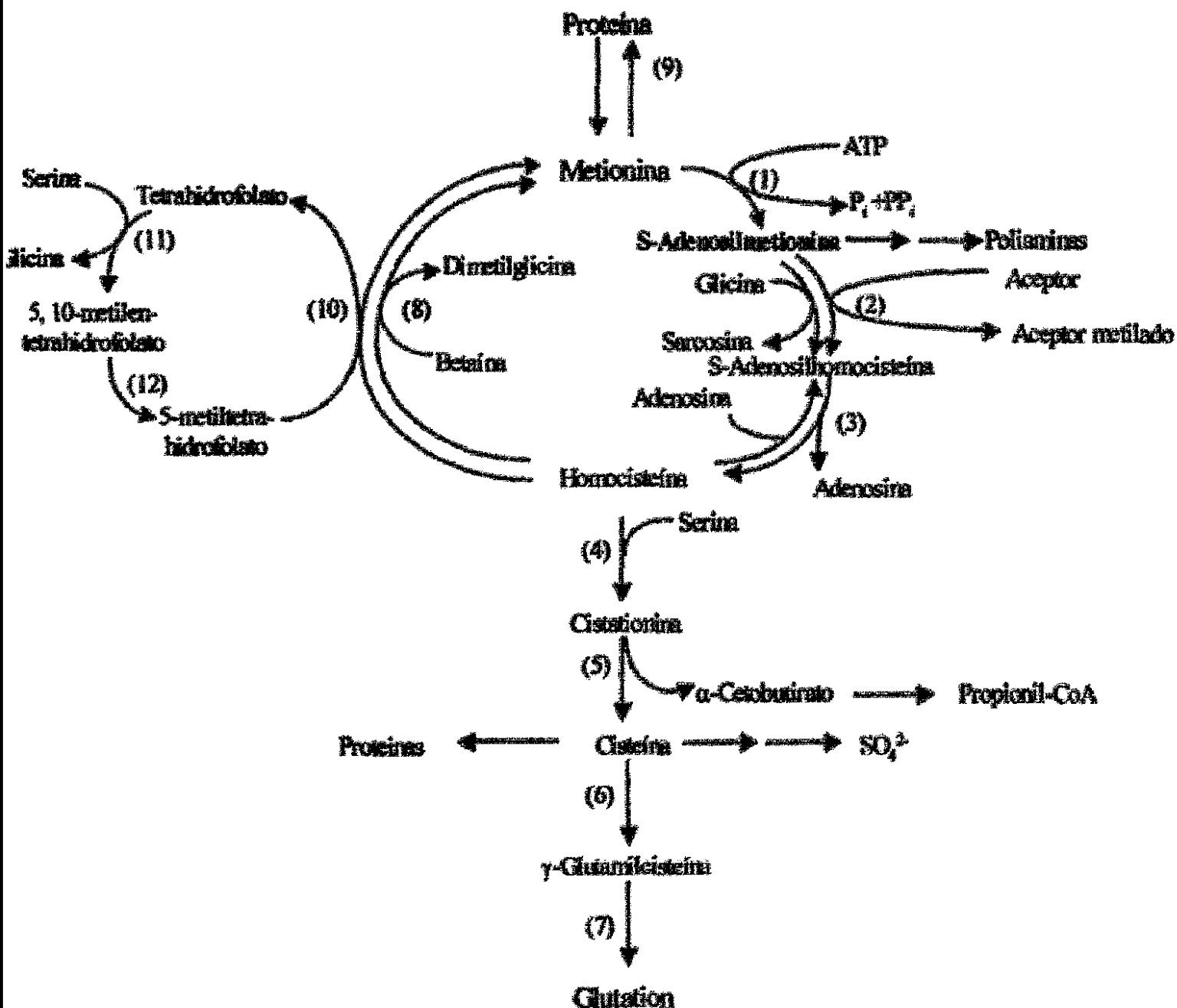


Figura C. El ciclo de la metionina en el hígado de mamíferos. Los números representan las enzimas específicas que intervienen en cada reacción enzimática. 1. Metionina adenosiltransferasa; 2. Homocisteína transmetilasa; 3. S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa; 4. Cistationina β-aminasa; 5. γ-Cistationasa; 6. γ-Glutamileisteína sintasa; 7. Glutatión sintasa; 8. Betaina homocisteína metiltransferasa; 9. Equilibrio entre la metionina de la proteína y la metionina libre; 10. 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferasa (metionina sintasa); 11. Serina oxidasa; 12. 5, 10-metiltetrahidrofolato reductasa

Numerosos estudios de experimentación en animales han demostrado la eficacia de la AdoMet en la prevención del daño hepático provocado por una gran variedad de agentes químicos (tetracloruro de carbono, alcohol, paracetamol entre otros), por isquemia-reperfusión y colestasis (Mato y cols.,1997). Además, se ha confirmado el potencial terapéutico de AdoMet en el tratamiento de la hepatopatía alcohólica, la colestasis y la cirrosis en humanos (Vendemiale y cols., 1989; Frezza y cols., 1988 y 90; Mato y cols., 1999; Lieber, 1999).

**OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

1. Estudiar la expresión de la enzima ONSi y los niveles de acumulación de NT en biopsias hepáticas de pacientes con HCV, correlacionando ambos con la intensidad de la lesión histológica.
2. Estudiar la implicación de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ , el VHB y la proteína HBx en el control de la expresión de la ONSi en líneas celulares derivadas de hepatocitos humanos.
3. Analizar el efecto de la AdoMet sobre la expresión de la ONSi hepática en ratas tratadas con LPS, así como en hepatocitos de rata y líneas celulares derivadas de hepatocitos humanos estimulados con citocinas proinflamatorias.



·  
·  
·  
·

**MATERIALES Y METODOS**

## MATERIALES Y METODOS

### **Caracterización de los pacientes.**

La caracterización bioquímica, virológica e histológica de los pacientes utilizados en este trabajo de investigación ha sido previamente descrita (Majano y cols., 1998; García-Monzón y cols., 2000; anexos 1 y 2 en esta Tesis Doctoral).

### **Estudios de expresión tisular de ONS y NT.**

Los anticuerpos y sondas utilizadas para el estudio de la expresión intrahepática de la enzima ONSi, los anticuerpos utilizados para el estudio de acumulación de NT así como las técnicas de inmunohistoquímica (inmunoperoxidasa indirecta y doble-marcaje) e hibridación "in situ" han sido previamente descritos en los distintos anexos de esta Tesis Doctoral (Majano y cols., 1998; García-Monzón y cols., 2000; Majano y cols., 2001a: sometido Hepatology; Majano y cols., 2001b: sometido Hepatology).

### **Reactivos, plásmidos y anticuerpos.**

Los reactivos se obtuvieron de las siguientes fuentes: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IFN- $\gamma$  (Genzyme, Cambridge, MA), análogo soluble de dexametasona D-2915, (Sigma, St. Louis, MO). La AdoMet, en forma de sal estable sulfato de p-toluenosulfonato, producida por Knoll Farmaceutici (Milan, Italia), fue suministrada por Europharma (Madrid, España).

Los plásmidos pSVX, pSV-Hygro y pSV- $\beta$ -Gal contienen los marcos de lectura abierta (ORF) de la HBx, el gen de resistencia a higromicina y la  $\beta$ -galactosidasa, respectivamente, bajo el control del promotor de SV-40, fueron cedidos por el Dr. Massimo Levrero (Cagliari, Italia) (Chirillo y cols., 1996). Los plásmidos pMMTV-K y pMMTV-CAT, también cedidos por el Dr. Levrero, contienen los fragmentos abiertos de lectura de HBx y CAT bajo el control del promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV), inducible por dexametasona (Chirillo y cols., 1997). Los plásmidos reporteros pGLNOS 8.3-Luc wt conteniendo 8.3 kB del promotor del gen de la ONSi humano y los plásmidos pGLNOS NF-kBd, pGLNOS NF-kBu, pGLNOS NF-kBd,u, pGLNOS AP-1d, pGLNOS AP-1u, pGLNOS AP-1d,u que contienen distintas mutaciones puntuales simples o dobles del mismo promotor, introducidas en el plásmido pGL3 Basic (Promega), fueron amablemente cedidos por el Dr. J Moss (Bethesda, USA) (Marks-Konczalik y cols., 1998). Los plásmidos pro-Luc contiene el promotor mínimo de la prolactina de rata, y pAP1pro-Luc contiene cuatro copias del sitio TRE

del promotor de la colagenasa delante de éste han sido descritos previamente (Rincón y Flavell, 1994). Los plásmidos pCMV-HBx-NLS, conteniendo el fragmento abierto de lectura del gen de HBx con la secuencia de localización nuclear del antígeno T de SV40, pCMV-HBx-SLN con la secuencia de localización nuclear mutada y el plásmido control pECP4 fueron cedidos por el Dr. E. Schneider (New York, USA) (Doria y cols., 1995).

Las características de los anticuerpos utilizados se describen en la siguiente tabla

ANTICUERPO	DESCRIPCIÓN	TÉCNICA	PROCEDENCIA
<b>PRIMARIOS</b>			
Anti-ONSi	Ac m	IHQ	Transduction Lab
Anti-ONSi	Ac p	WB	Transduction Lab
Anti-ONSi	Ac p	WB	Santa Cruz
Anti-ONSn	Ac p	IHQ	Transduction Lab
Anti-ONSe	Ac p	IHQ	Transduction Lab
Anti-E-Sclerina (TEA3/1)	Ac m	IHQ	Dr. Sánchez-Madrid (1)
Anti-Digoxigenina FA conj.	Ac m	HIS	Boehringer Mannheim
Anti-NT	Ac m	IHQ	Upstate Biotechnology
P3X63	Ac m	IHQ	Dr. Sánchez-Madrid (1)
Anti CD 11 c (HC1/1, 1)	Ac m	IHQ	Dr. Sánchez-Madrid (1)
Anti-HBcAg	Ac p	IHQ	Dako
Anti- $\beta$ Actina	Ac p	WB	Sigma
Anti-HBx	Ac m	IP, WB	Dr. Slagle (2)
Anti-Flag	Ac m	IF	Sigma
Anti-p50	Ac p	EMSA	Santa Cruz
Anti-p65	Ac p	EMSA	Santa Cruz
Anti-p52	Ac p	EMSA	Santa Cruz
Anti-Rel B	Ac p	EMSA	Santa Cruz
Anti-c Rel	Ac p	EMSA	Santa Cruz
Anti-I $\kappa$ B $\alpha$	Ac p	WB	Santa Cruz
Anti-I $\kappa$ B $\beta$	Ac p	WB	Santa Cruz
<b>SECUNDARIOS</b>			
Anti-Ratón HRP conj.	Ac p	IHQ	Dako
Anti-Conejo HRP conj.	Ac p	IHQ	Pierce, Dako
Anti-Cabra HRP conj.	Ac p	WB	Amersham
Anti-Conejo	Ac p	IP	Dako
Anti-Ratón	Ac p	HIS	Dako
FAAFA		HIS	Boehringer Mannheim
Anti-Ratón FITC conj.	Ac m	IF	Scotlec

**Tabla 1. Abreviaturas.** Ac m: anticuerpo monoclonal; Ac p: anticuerpo policlonal; IHQ: inmunohisto-química; WB: western blot; HIS: hibridación "in situ"; IP: inmunoprecipitación; EMSA: ensayos de movilidad electroforética. FA: fosfatasa alcalina; FAAFA: fosfatasa alcalina anti-fosfatasa alcalina; FITC: isotiocianato de fluoresceína; HRP: peroxidasa de rábano (1) Hospital de la Princesa, Madrid; (2) Universidad de Houston, Texas.

### **Líneas celulares y condiciones de cultivo.**

La línea de hepatoblastoma humano HepG2 y las líneas de origen hepático humano Chang liver (ATCC; CCL13) y H3B fueron cultivadas en DMEM, 10% suero bovino fetal, 2 mM L-glutamina y 50 µg/ml gentamicina y se crecieron a 37 °C al 5% de CO<sub>2</sub>. La línea 2.2.15, derivada de HepG2 que contiene 2 copias en tándem del genoma completo de HBV, se creció en presencia de 1 mg/ml G418. Las líneas CMO y CMX, se generaron por transfección estable de la línea Chang liver con los plásmidos pMMTV-CAT (CMO) y pMMTV-X (CMX), que expresan el enzima CAT o la proteína HBx, respectivamente, de forma inducible por glucocorticoides. Los clones se aislaron en presencia de 0.2 mg/ml higromicina y la expresión de HBx se comprobó mediante RT-PCR y western blot como se indica más abajo. Los experimentos con estos transfectantes se corroboraron con dos clones distintos.

Los hepatocitos de rata se aislaron de ratas Wistar albinas (250 gr) por el método de perfusión con colagenasa (Castaño y cols., 1980). Las células se depositaron en placas colagenizadas en medio DMEM, suplementado con 10 % suero bovino fetal , 2 mM L-Glutamina y 50 µg/ml gentamicina, y se crecieron a 37 °C al 5% de CO<sub>2</sub> durante 90 minutos para permitir su adhesión. Tras esta incubación el medio de cultivo se reemplazó por un medio de la misma composición pero con suero bovino fetal al 2,5%..

### **Extracción de ARN y northern blot.**

Tras tratar las células con los diferentes estímulos, el ARN se extrajo utilizando el kit comercial Ultraspec (Biotecx, Houston, TX). El ARN total se separó en un gel de agarosa, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se hibridó con las siguientes sondas marcadas con <sup>32</sup>P: fragmento Eco RI-HindIII de 1.1 kb del ADNc de la ONSi y fragmento AccI/BglII de 0.9 kb del genoma de HBV, subtipo adw. Como control se analizó la expresión de los genes de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y β-actina.

### **RT-PCR.**

La expresión de la ONSi y de la HBx (en células estimuladas o no CM y/o preincubadas con 1 µM dexametasona durante 16 h), se analizó por RT-PCR como se ha descrito anteriormente (Majano y cols., 1998; Lara-Pezzi y cols., 2001 en prensa) utilizando el kit Gene Amp RNA PCR core kit (Perkin-Elmer. Corp., Norwalk, CT). Como control se analizó la expresión de ARNm de la β-actina. La secuencia de los nucleótidos utilizados son las siguientes:

HBx     dTGCTAGGCTGTACTGCCAACT y dTTGCATGGTGTCTGGTGCCGAG  
ONSi    dTGCCAGATGGCAGCATCAGA y dACTTCTCCAGGATGTTGAT.  
 $\beta$ -actina dATCTGGCACCACCACCTTCTACAATGAGCTGCC y  
dCGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTTGC.

#### **Transfecciones y ensayos de actividad luciferasa.**

Las líneas celulares se transfectaron, al 50% de confluencia, con distintas cantidades de ADN usando el reactivo de lipofección DOSPER (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Con la finalidad de normalizar la eficiencia de las transfecciones, se transfectó el plásmido pRLNull midiéndose la actividad luciferasa de las dos enzimas utilizando el Dual Luciferase Assay Kit (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En los experimentos de transactivación, las células se transfectaron con cantidades variables del plásmido pSV-X y se utilizó el plásmido pSV-Hygro para mantener constante la cantidad de ADN transfectada en cada punto. Los tratamientos con Dex (1  $\mu$ M) se realizaron 16 horas antes de recoger las células. El efecto de las citocinas proinflamatorias se valoró tras estimulación durante 8 horas.

#### **Cuantificación de los niveles de nitritos y ON.**

Para cuantificar la actividad enzimática de la ONSi en los experimentos "in vitro", se midieron los niveles de nitritos acumulados en el medio de cultivo utilizando la técnica de De Griess (Green y cols., 1982). En el análisis de los niveles séricos de ON se utilizó el analizador de quimioluminiscencia NOA 280 (Sievers) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y según se ha descrito previamente (Avila y cols., 1998).

#### **Ensayos de retardo de la movilidad electroforética.**

Se prepararon extractos nucleares a pequeña escala, de células tratadas o no con la mezcla de citocinas proinflamatorias como se ha descrito previamente (Schreiber y cols., 1989). Adicionalmente, las líneas CMO y CMX fueron preincubadas o no con 1 mM de dexametasona durante 16 horas antes de la estimulación con citocinas. Para valorar los efectos de la AdoMet en la actividad de NF- $\kappa$ B las células fueron preincubadas o no con distintas cantidades de AdoMet durante 30 minutos previamente a la estimulación. Las reacciones de unión se llevaron a cabo a 4°C en 18.5  $\mu$ l de volumen total (10 mM Hepes pH 7.6, 10% glicerol, 50 mM KCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2.5  $\mu$ g poli(dI-dC), 0.75-1 ng de sonda marcada radiactivamente en 3' y 2  $\mu$ g de extracto nuclear). Los complejos se resolvieron en un gel de

poliacrilamida (4%) como se ha descrito anteriormente (Lara-Pezzi y cols., 1998b). La secuencia de los oligonucleótidos utilizados son las siguientes:

NF $\kappa$ B ONSi 1	d GGCTGGGGACACTCCCTTT
NF $\kappa$ B ONSi 2	d GAAAGGGAGTGTCCCCAGC
NF $\kappa$ B ONSi 1 mut	d GGCTGATAACACTAACTTT
NF $\kappa$ B ONSi 2 mut	d GAAAGTTAGTGTATCAGC
NF $\kappa$ B consenso 1	d GAGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC
NF $\kappa$ B consenso 2	d GGCCTGGAAAGTCCCCTCAACT
SP-1 consenso 1	d GATTCGATCGGGGCGGGCGAG
SP-1 consenso 2	d GCTCGCCCCGCCCGATCGAAT
AP-1 1	d GCGCTTGATGAGTCAGCCGGAA
AP-1 2	d G TTCCGGCTGGACATCAAGCGC

Los ensayos de súper-retardo se realizaron añadiendo 0.5  $\mu$ l de los anticuerpos indicados 10 minutos antes de añadir la sonda marcada.

#### **Inmunofluorescencia indirecta.**

Para estos experimentos las células fueron plaqueadas sobre cubreobjetos y tras 16 horas fueron transfectadas con los plásmidos pCMV-HBx-NLS, pCMV-HBx-SLN y pECP4. Treinta y seis horas después la localización subcelular de HBx se analizó por inmunofluorescencia indirecta, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-Flag (Santa Cruz), de acuerdo con lo descrito en el anexo 3 de esta Tesis Doctoral.

#### **Western blot.**

Para los experimentos de western blot los extractos proteicos se analizaron como se describe en los distintos anexos. Las diluciones de los anticuerpos se indican en los respectivos pies de figura.

#### **Inmunoprecipitación.**

La detección de la proteína HBx en las células CMO y CMX, tratadas o no con dexametasona 1  $\mu$ M durante 16 horas, se realizó una incubación secuencial con el conejo-anti-HBx (Slagle y cols., 1996), el cabra-anti-conejo (Dako) y proteína G sefarosa (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Los inmunoprecipitados se analizaron por western como se ha descrito previamente (Lara-Pezzi y cols., 2001; en prensa)

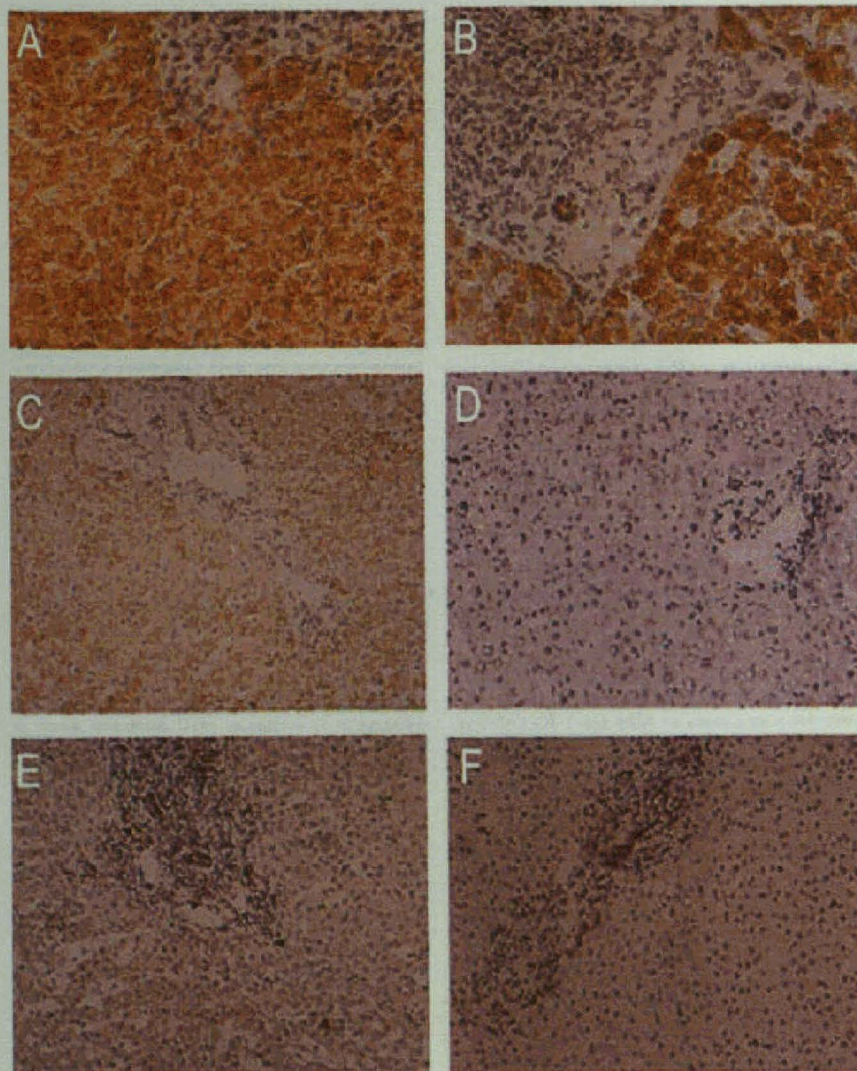
## RESULTADOS.

### 1. EXPRESION DE LA ONSI EN LA HCV.

#### 1.1. Patrón intrahepático de expresión de la ONSi en la HCV.

El estudio inmunohistoquímico en biopsias hepáticas, mediante inmunoperoxidasa indirecta utilizando un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer la ONSi humana (1µg/ml), determinó la existencia de una marcada expresión tisular de ONSi en pacientes con infección crónica por el VHB y por el VHC (Figura 1-Panels A y B, respectivamente). La inmunoreactividad se detectó principalmente en la región citoplasmática de los hepatocitos, ampliamente distribuidos en los lóbulos hepáticos, con un patrón muy similar en ambos grupos de pacientes. Sin embargo, en las biopsias hepáticas de pacientes con esteatosis alcohólica y colestasis el nivel de expresión detectado fue bajo, encontrándose algunos hepatocitos positivos localizados preferentemente en las zonas periportal y perivenular (Figura 1-Panel C). Un hallazgo interesante fue que la expresión de la ONSi en hígados histológicamente normales fue siempre negativa (Figura 1-Panel D). En todos los casos analizados no se detectó marcaje en células mononucleares ni en endotelio vascular o sinusoidal.

Debido a que el anticuerpo utilizado para detectar la ONSi puede reconocer también la isoforma neuronal (Amin y cols., 1995), realizamos experimentos utilizando un anticuerpo policlonal (1µg/ml) capaz de reconocer específicamente esta isoforma y obtuvimos siempre resultados negativos (Figura 1-Panel E), lo que indicaba que la reactividad observada correspondía específicamente a la ONSi. Como control de especificidad se utilizó un anticuerpo anti-E-selectina, del mismo isotipo (IgG2a) y a la misma concentración que el anti-ONSi, resultando en todos los casos un marcaje negativo (Figura 1-Panel F).

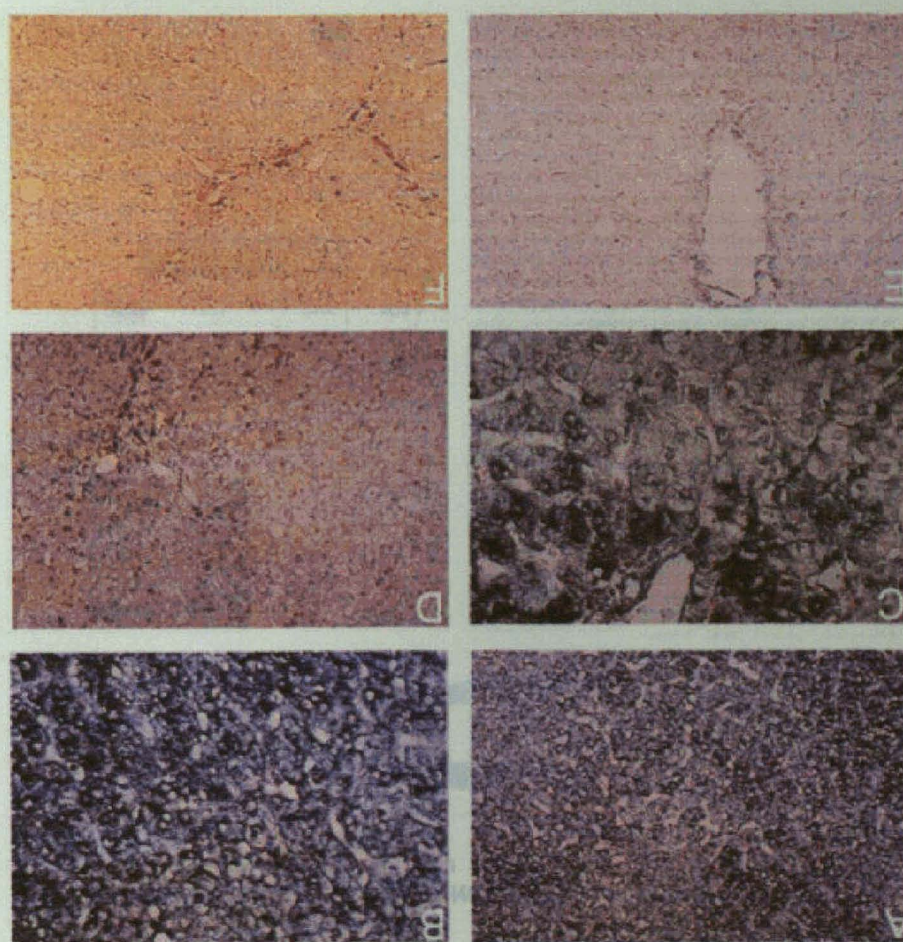


**Figura 1. Estudio inmunohistoquímico de expresión de ONSi en biopsias hepáticas.** Se observó una inmunoreactividad intensa (marcaje marrón) para ONSi tanto en pacientes con HC por VHB (Panel A, x 500) como por VHC (Panel B, x 500). Sin embargo, en pacientes con colestasis asociada a colestiasis el nivel de expresión era mucho menor (Panel C, x 300). En individuos con hígado histológicamente normal no se detectó señal alguna (Panel D, x 300). La isoforma neuronal no fue detectada en ningún tipo de pacientes (Panel E, x 300; paciente con HCV). Como control negativo se utilizó un anticuerpo monoclonal anti E-selectina TEA 3/1 observándose siempre un marcaje negativo.

Los experimentos de hibridación "in situ", utilizando una sonda de ARN "antisentido" marcada con digoxigenina obtenida a partir del ADNc del gen de la ONSi humana, mostraron la presencia de altos niveles de transcritos de ONSi en secciones hepáticas de pacientes con HCV (Figura 2- Paneles A, B y C). Los hepatocitos mostraban una gran positividad con un patrón similar al observado en los experimentos de inmunohistoquímica. Sin embargo, se



observaron algunas células mononucleares y de endotelio vascular con reactividad positiva, lo que contrastaba con el resultado negativo obtenido por inmunohistoquímica. En pacientes con esteatosis alcohólica o colestasis se detectaron algunos hepatocitos positivos restringidos a las zonas periportal y perivenular (Figura 2-Panel D). En individuos normales no se observó positividad alguna (Figura 2-Panel E). En los experimentos control, utilizando una sonda sentido, no se observó ningún tipo de señal positiva (Figura 2-Panel E).



**FIGURA 2. Estudio por hibridación "in situ" de la expresión de ARNm de ONSI en biopsias hepáticas utilizando sondas de ARN marcadas con digoxigenina.** Se observó una reactividad intensa para ONSI en pacientes con HCV (Panel A, x 300; Panel B, x 500). Además se observó marcaje en el endotelio de la vena central del mismo paciente (Panel C, x500). Sin embargo, en pacientes con colestasis el nivel de expresión era mucho menor o no era detectado (Panel D, x 300). En biopsias hepáticas histológicamente normales no se detectó la presencia de ARNm de ONSI (Panel E, x 300). Como control negativo se utilizó una "sonda sentido"; no detectándose en ningún caso reactividad positiva (Panel F, x300).

## 1.2. Relación entre el grado de expresión intrahepático de la ONSi y la actividad inflamatoria de la HCV.

Buscando una posible correlación entre la expresión intrahepática de la ONSi y la actividad inflamatoria de las biopsias de pacientes con HCV, dividimos estos pacientes en dos grupos atendiendo al índice de actividad histológica (IAH) de Knodell (inflamación portal, periportal y lobulillar; IAH bajo o menor de 5 e IAH alto o mayor de 10). El establecimiento de un índice semicuantitativo para caracterizar el grado de expresión de ONSi permitió comparar dicha expresión en los distintos grupos. Los datos de este análisis se recogen en la Tabla 1.

Diagnóstico	IAH Bajo (<5)	IAH Alto (>10)
HCB	(n= 5) 2.2±1	(n= 6) 2.6±0.8
HCC	(n= 9) 2.3±1	(n=14) 2.6±0.8
ALC	(n= 9) 1.6±1*	
CL	(n=10) 1.2±0.6**	

Tabla 1. Relación entre el grado de expresión intrahepático de ONSi y la actividad inflamatoria de la HCV. Los datos se expresan como media±desviación estándar. Índice de expresión 0, marcaje negativo; 1, marcaje medio y focal; 3, marcaje intenso y difuso. HCB: Hepatitis crónica B; HCC: Hepatitis crónica C; ALC: Patología alcohólica; CL: Colestasis. \*p<0.05 vs HCB y HCC; \*\*p<0.01 vs HCB y HCC.

Este análisis reveló el hecho de que no existía una diferencia significativa entre el grado de expresión de la ONSi y el IAH en pacientes con HCV, tanto por VHB como por VHC, mientras que sí se observaba cuando comparáramos el grado de expresión entre estos grupos y los pacientes con hepatopatías no víricas. Estos datos sugerían que la infección vírica podría jugar un papel activo en el incremento de expresión de la ONSi detectado en los pacientes con HCV.

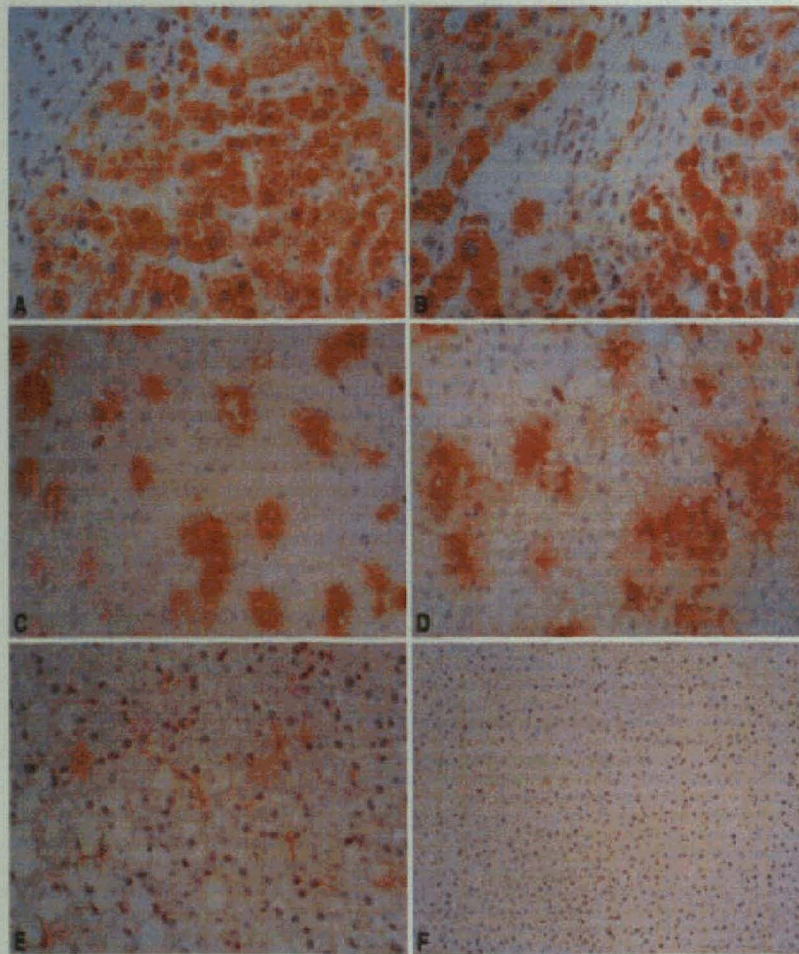
## 2. DETECCIÓN DE NT EN LA HCV.

### 2.1. Acumulación intrahepática de NT en la HCV.

Distintas líneas de investigación han sugerido que algunos de los efectos asociados a la producción de ON durante los procesos inflamatorios crónicos estarían mediados a través de la formación de peroxinitrito y no por el ON directamente. La aparición de NT se considera como uno de los marcadores de la interacción del peroxinitrito con proteínas celulares (Beckman, 1996), por lo que decidimos valorar los niveles de acumulación de NT en las biopsias hepáticas de pacientes con HCV.

Como ya comentamos anteriormente, detectamos un alto nivel de expresión de la ONSi en biopsias de pacientes con HC por VHB y por VHC en la mayoría de hepatocitos distribuidos en los lobulillos hepáticos (Figura 3-Paneles A y B). Cuando las biopsias de estos pacientes se analizaron mediante experimentos de inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo monoclonal (1 µg/ml) capaz de reconocer proteínas con residuos de tirosina nitrosilada (NT), se detectaron grupos de células positivas formados por hepatocitos y células sinusoidales, distribuidos por los lobulillos hepáticos con un patrón focal y sin una clara relación con las zonas lobulillares o periportales de inflamación o necrosis. La inmunoreactividad detectada fue bastante similar en pacientes con HC por VHB o VHC (Figura 3-Paneles C y D). A nivel celular el patrón de tinción para NT era fundamentalmente submembranoso, mientras que el de la ONSi era difuso y localizado en el citoplasma. El marcaje de secciones hepáticas seriadas demostró que sólo algunos de los hepatocitos que eran positivos para ONSi lo eran también para NT.

En biopsias de pacientes con enfermedades de etiología no vírica (esteatosis alcohólica y colestasis) se detectaron bajos niveles de acumulación de NT, reducido a algunos hepatocitos en focos dispersos (Figura 3-Panel E), mientras que en biopsias de hígados histológicamente normales no se detectó marcaje para NT (Figura 3-Panel F). Como control de especificidad se utilizó el anticuerpo PX63 del mismo isotipo (IgG1) y a la misma concentración que el utilizado para detectar NT, resultando en todos los casos un marcaje negativo (no mostrado).



**Figura 3. Estudio inmunohistoquímico de la expresión de ONSi y NT en biopsias hepáticas.** Se observó una intensa señal positiva para la ONSi (marcaje marrón) en el citoplasma de hepatocitos distribuidos a través de los lobulillos hepáticos con un patrón difuso tanto para pacientes con HC por el VHB (Panel A, x 450) como por el VHC (Panel B, x 450). Sin embargo, la inmunoreactividad para NT (marcaje marrón) se observó restringida a grupos de células, formados por hepatocitos y sinusoidales, con un patrón de distribución focal, en ambos grupos de pacientes (Panel C, x 450; VHB: Panel D, x 450; VHC). En pacientes con enfermedad hepática de etiología no vírica, se observó un nivel de marcaje de NT menor, reducido a algunos hepatocitos distribuidos en focos aislados en el parénquima hepático (Panel E, x 450; esteatosis alcohólica). En todos los tejidos procedentes de hígados histológicamente normales no se detectó marcaje para NT (Panel F, x 250).

Para determinar si existían distintos niveles de expresión de ONSi y NT en función de la patología comparamos, mediante un análisis semicuantitativo, los niveles de expresión para ambos en los distintos grupos de pacientes estudiados. Los resultados se recogen en la Tabla 2.

Diagnóstico	Nº de Pacientes	Marcaje ONSi	Marcaje NT
HCB	22	2.7±0.5	1.8±0.6
HCC	32	2.5±0.6	1.5±0.5
CL	10	1.2±0.6*	0.9±0.7*
EA	8	1.1±0.5*	0
HN	7	0	0

**Tabla 2. Relación entre el grado de expresión intrahepático de ONSi y acumulación de NT.** Los datos se expresan como media±desviación estándar. \* $p < 0.01$  vs HCB y HCC. HCB: Hepatitis crónica B; HCC: Hepatitis crónica C; CL: Colestasis; EA: Esteatosis; HN: Hígado histológicamente normal

El dato más importante fue que los niveles de expresión de ONSi y NT eran significativamente mayores en pacientes con HCV respecto al resto de grupos analizados.

Adicionalmente, para determinar la posible asociación entre la expresión de ONSi y NT llevamos a cabo experimentos de doble marcaje inmunohistoquímico en biopsias de pacientes con HCV.



**Figura 4. Estudio inmunohistoquímico de doble marcaje en biopsias hepáticas de pacientes con HCV.** Estos experimentos pusieron de manifiesto la existencia de una co-localización, detectada por la aparición de un marcaje grisáceo, entre los marcaje para ONSi (marcaje marrón) y NT (marcaje violeta), en una proporción significativa de hepatocitos (panel A, x 450). Paralelamente, se observó que la mayoría de las células macrofágicas (marcaje marrón, anti-CD11 c positivas, Acm HC1/1; 1 µg/ml), aparecían doblemente marcadas (marcaje grisáceo) tras la utilización de un anticuerpo anti-NT (marcaje violeta) (panel B, x 450). Además, los focos celulares positivos para NT (marcaje violeta) se localizaban próximos a hepatocitos que expresaban el HbAg del VHB (marcaje marrón con patrón nuclear, Anti-HbAg positivas; Acp 1µg/ml) (panel C, x 450).

Los resultados demostraron la existencia de una co-localización de ambos marcajes en una gran proporción de los hepatocitos con reactividad positiva para NT (Figura 4-Panel A). Además, observamos que la mayoría de los macrófagos sinusoidales (células de Kupffer, CD11c positivas) se teñían con el anticuerpo frente a NT (Figura 4-Panel B). Finalmente, para confirmar la hipótesis de que las zonas de acumulación de NT podían estar en relación con las zonas de replicación vírica más activa llevamos a cabo experimentos de doble marcaje en muestras con HC por VHB, utilizando anticuerpos frente a la proteína del core del VHB y a NT. Observamos cómo la mayoría de los focos intrahepáticos que contenían células positivas para NT presentaban una estrecha relación espacial con hepatocitos que expresaban el antígeno del core del VHB (Figura 4-Panel C).

## 2.2 Relación entre el índice inmanohistoquímico de marcaje de NT y la gravedad histológica de la HCV.

Con el fin de relacionar la intensidad del marcaje de NT y la gravedad histológica de las HCV, dividimos las biopsias en dos grupos, según la clasificación de Scheuer: pacientes con enfermedad hepática leve (con índice histológico menor o igual a 4) y grave (mayor de 4) y comparamos los índices de intensidad del marcaje de NT. Los datos se recogen en la Tabla 3.

	HCB		HCC	
	HCL (n=10)	HCS (n=12)	HCL (n=18)	HCS (n=14)
Marcaje NT	1.1±0.5	2.5±0.7 *	0.9±0.5	2.1±0.5*

Tabla 3. Los datos se expresan como media±desviación estándar. \*p<0.01 vs HCL. NT: Nitrotirosina; HCB: Hepatitis crónica B; HCC: Hepatitis crónica C; HCL; Hepatitis crónica leve; HCS; Hepatitis crónica severa.

El dato más relevante demostró que los niveles de acumulación de NT se correlacionan significativamente con la gravedad de la lesión histológica en pacientes con HCV tanto por VHB como por VHC.

### 3. ANÁLISIS DE FACTORES QUE MODULAN LA EXPRESIÓN DE LA ONSI EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE HEPATOCITOS HUMANOS.

#### 3.1. Expresión de la ONSi en líneas transfectadas establemente con el VHB.

Debido a que la expresión tisular de ONSi parecía estar asociada a la infección vírica (Tabla 1) decidimos estudiar la expresión de esta enzima en la línea celular 2.2.15, derivada de la línea HepG2 pero establemente transfectada con el VHB (Sells y cols., 1987). Como primer paso analizamos la expresión de transcritos virales del VHB en ambas líneas celulares por northern blot y comprobamos que sólo la línea 2.2.15, pero no la parental HepG2, expresaba dichos transcritos (Figura 5. Panel A).

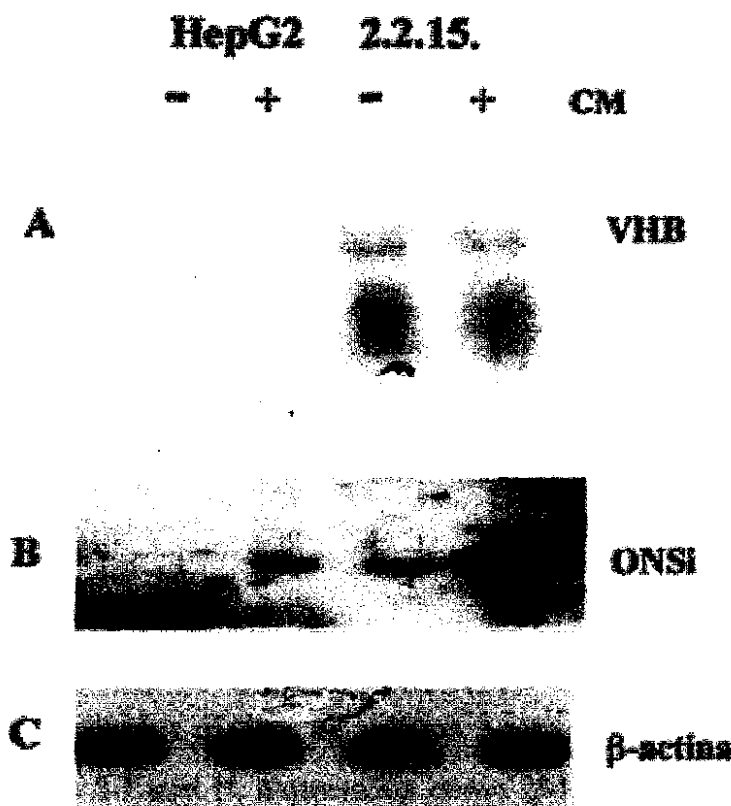


Figura 5. Expresión de ARNm de la ONSi en células establemente transfectadas con el VHB. Se analizaron los niveles de ARNm de HBV y ONSi en células HepG2 y 2.2.15 tanto a nivel basal como tras estimulación con CM durante 4 horas por northern blot. Panel A. Análisis de los niveles de transcritos del HBV. Panel B. Análisis de los niveles de ARNm de ONSi. Panel C. Niveles de β-actina. Los resultados mostrados son significativos de cuatro experimentos independientes.

A continuación analizamos la expresión de ARNm y proteína ONSi, tanto a nivel basal como tras la estimulación con una mezcla de citocinas proinflamatorias (CM, conteniendo IL-1β, TNF-α e IFN-γ, 250 unidades internacionales (UI)/ml para cada una de las tres citocinas) durante 4 y 24 horas. Previamente, determinamos que era necesaria la estimulación con estas tres citocinas y a las concentraciones citadas para lograr la máxima expresión de ONSi. Además, como ya había sido descrito por otros autores en hepatocitos

humanos (Geiler y cols., 1993 y 95), comprobamos que la IL-1 $\beta$  era la única citocina capaz de inducir por sí sola la expresión, en el rango de dosis utilizada, mientras que el TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  sinergizaban con IL-1 $\beta$  para obtener un mayor nivel de expresión (datos no mostrados). Los niveles de expresión de ONSi en células HepG2 no estimuladas, tanto a nivel de ARNm (Figura 5-Panel B) como de proteína (Figura 6-Panel A, superior), fueron indetectables; sin embargo, la estimulación con CM provocó su aparición. De manera significativa, en la línea celular 2.2.15 se observó expresión a nivel basal, siendo los niveles detectados aún mayores cuando estas células fueron estimuladas con CM. Como control se analizaron los niveles de ARNm (Figura 5-Panel C) y proteína de  $\beta$ -actina (Figura 6-Panel A, inferior).

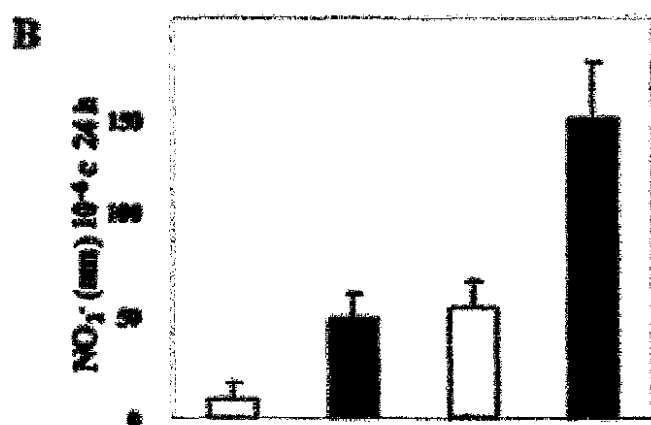
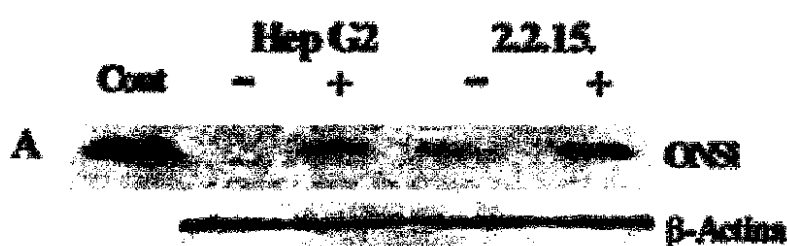


Figura 6. Expresión de proteínas y actividad enzimática de la ONSi en células establemente transfectadas con el VHB. Los niveles de proteína y nitritos se analizaron en células HepG2 y 2.2.15 tanto a nivel basal como tras estimulación durante 24 h con CM. Panel A. Análisis de los niveles de proteína de ONSi (western blot; Acp anti-iNOS, 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ), como control positivo se utilizó un extracto proteico de células murinas Raw 264.7 estimuladas con LPS+IFN- $\gamma$  (superior). Niveles de  $\beta$ -actina (Acp anti  $\beta$ -actina 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , inferior). Panel B. Niveles de nitritos (reacción de Griess). Los resultados mostrados son representativos de cuatro experimentos independientes.

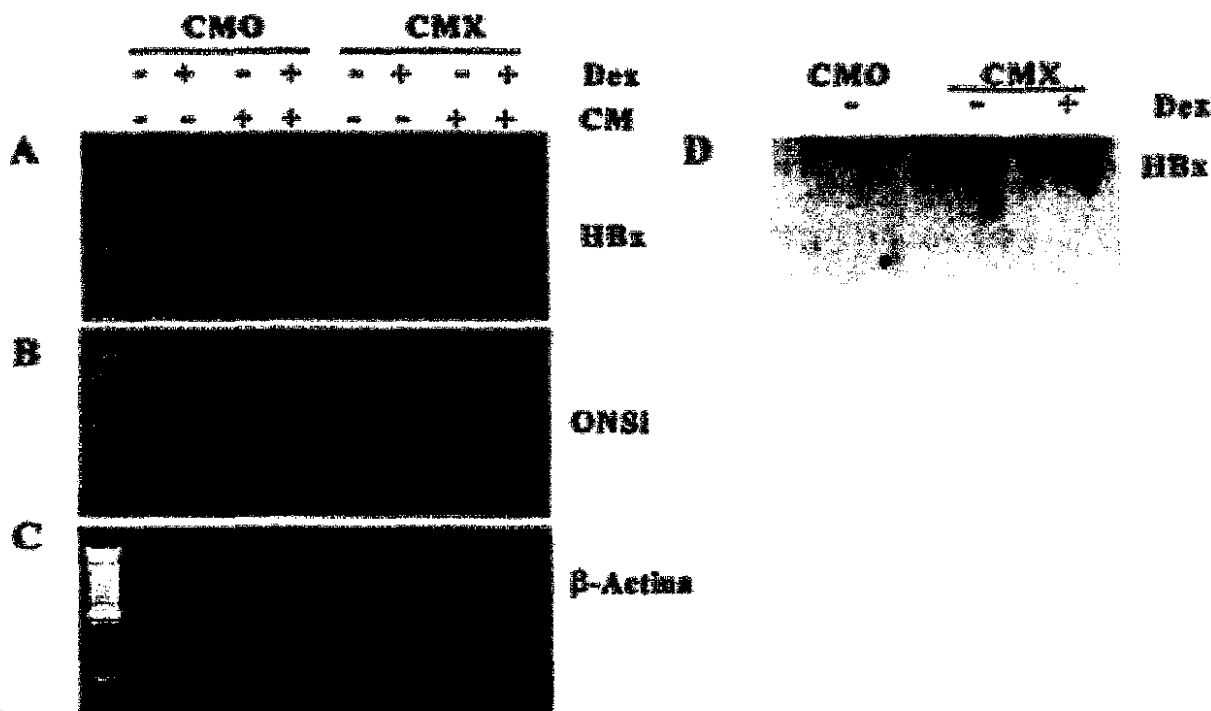
Paralelamente, medimos la actividad enzimática de la ONSi, a través de la cuantificación de los niveles de nitritos acumulados en el sobrenadante de los cultivos celulares (Figura 6-Panel B; expresados como nM de nitritos producidos por cada  $10^6$  células durante 24 horas), y observamos como los resultados obtenidos mostraban una gran correlación con los datos obtenidos por northern y western blot.

### 3.2. Expresión de la ONSi en líneas transfectadas establemente con la proteína HBx.

La proteína HBx del VHB tiene la capacidad de inducir la expresión de genes controlando la actividad de distintos factores de transcripción, entre los que se encuentran NF- $\kappa\text{B}$  y AP-1 (Murakami, 1999). Estos factores están directamente implicados en el control de la actividad



transcripcional del gen de la ONSi en hepatocitos humanos (Marks-Konczalik y cols., 1998; Taylor y cols., 1998b) por lo cual decidimos analizar la expresión de la ONSi en las líneas celulares CMO y CMX, siendo esta última capaz de expresar la HBx de una manera inducible.



**Figura 7.** Expresión de ARNs de ONSi en células establemente transfectadas con la HBx. Se analizaron los niveles de ARNm de HBx y ONSi por RT-PCR en células CMO y CMX, tanto a nivel basal como tras estimulación con CM durante 4 horas y/o habiendo sido pretratadas o no con Dex durante 16 horas. Paralelamente, para determinar la presencia de HBx en células CMX, se analizaron sus niveles por inmunoprecipitación + western blot. Panel A. Análisis de los niveles de ARNm de HBx. Panel B. Niveles de ONSi. Panel C. ARNm de  $\beta$ -actina. Panel D. Niveles de proteína HBx. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes realizados con dos clones distintos de CMO y CMX.

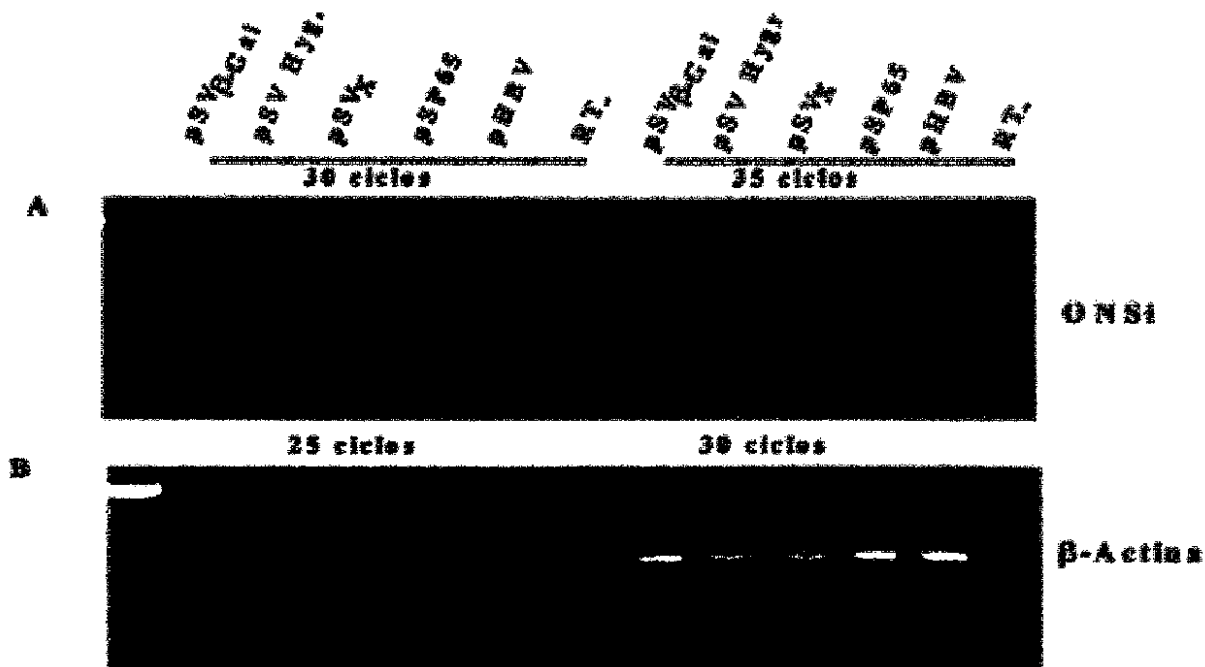
Como primer paso analizamos la expresión de ARNm de HBx, por RT-PCR (Figura 7-Panel A) y la expresión de proteína por inmunoprecipitación seguido de western blot (Figura 7-Panel D). La línea celular CMX pero no la CMO expresaba la HBx, tanto el ARN como la proteína HBx, a un bajo nivel que se incrementó tras la incubación durante 16 horas con dexametasona (Dex).

A continuación analizamos los niveles de expresión de la ONSi por RT-PCR. A pesar de que la Dex es capaz de inhibir la expresión de la ONSi (Geller y cols., 1993a), el hecho observado más destacable fue que las células CMX pero no las CMO, expresaban ARNm de ONSi en ausencia de estimulación con CM, independientemente del tratamiento con Dex (Figura 7-Panel B). Para evitar la influencia de la selección clonal se analizaron 2 clones de cada línea celular. El análisis de los niveles de ARNm del gen de la  $\beta$ -actina fue utilizado como control (Figura 7-Panel C).

### 3.3. Expresión de la ONSi en líneas transfectadas transitoriamente con el VHB y la proteína HBx.

Para descartar que la influencia de la proteína HBx o del VHB sobre la expresión de la ONSi pudiera deberse a diferencias clonales inespecífica realizamos experimentos de transfección transitoria en células HepG2, CCL13 y H3B con vectores de expresión del VHB y de la HBx, analizando a continuación el nivel de ARNm de la ONSi por RT-PCR.

La transfección con el vector de expresión del VHB (Figura 8-Panel A, pHBV, carriles 5 y 11) provocó la inducción la expresión de ARNm de la ONSi. Sin embargo, al transfectar el plásmido control (pSP65, carriles 4 y 10) no se detectó la presencia de transcritos. Adicionalmente, la transfección con el vector de expresión de la HBx (pSVX, carriles 3 y 9) provocó la expresión de la ONSi, y no así los plásmidos control (pSV $\beta$ -Gal y pSV-Hygro, carriles 4 y 10). Los resultados mostrados corresponden a células HepG2, obteniéndose resultados similares en células CCL13 y H3B (datos no mostrados.) Como control se analizó el gen de la  $\beta$ -actina (Figura 8-Panel B).



**Figura 8. Expresión de ARNm de la ONSi en células transfectadas transitoriamente con el VHB y la HBx.** Los niveles de ARNm de ONSi se analizaron por RT-PCR, con 30 y 35 ciclos de amplificación, en células HepG2 transfectadas con plásmidos de expresión del VHB (pHBV, utilizando como control negativo el plásmido pSP65) y HBx (pSVX, controles negativos pSV Hygro y pSV $\beta$ -Gal). Panel A. Análisis de los niveles ARNm de ONSi. Panel B. Análisis de los niveles de ARNm de  $\beta$ -actina. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes. En experimentos similares realizados con las líneas CCL13 y H3B se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados).

3.4. Control de la actividad transcripcional del gen de la ONSI.

3.4.1. Efecto de la HBx sobre la transcripción del gen de la ONSI.

Para determinar si la proteína HBx era capaz de inducir la expresión génica de la ONSI a través del incremento de la actividad de la región promotora del gen de la ONSI, las líneas HepG2 y CCL13 fueron transfectadas con 0,5 µg del plásmido pGLNOS wt, conteniendo 8,3 kb de dicha región acoplada al gen de la luciferasa, y cantidades crecientes de un vector de expresión de la HBx (pSVX).

En ambas líneas celulares (Figura 9-Panels A y B) se observó que la HBx era capaz de inducir la actividad transcripcional de la construcción con el promotor de la ONSI de una manera dosis-dependiente, sugiriendo que el mecanismo de transactivación no está restringido a una línea celular concreta. El efecto inductor no fue observado utilizando el vector vacío pGL3Basic (datos no mostrados).

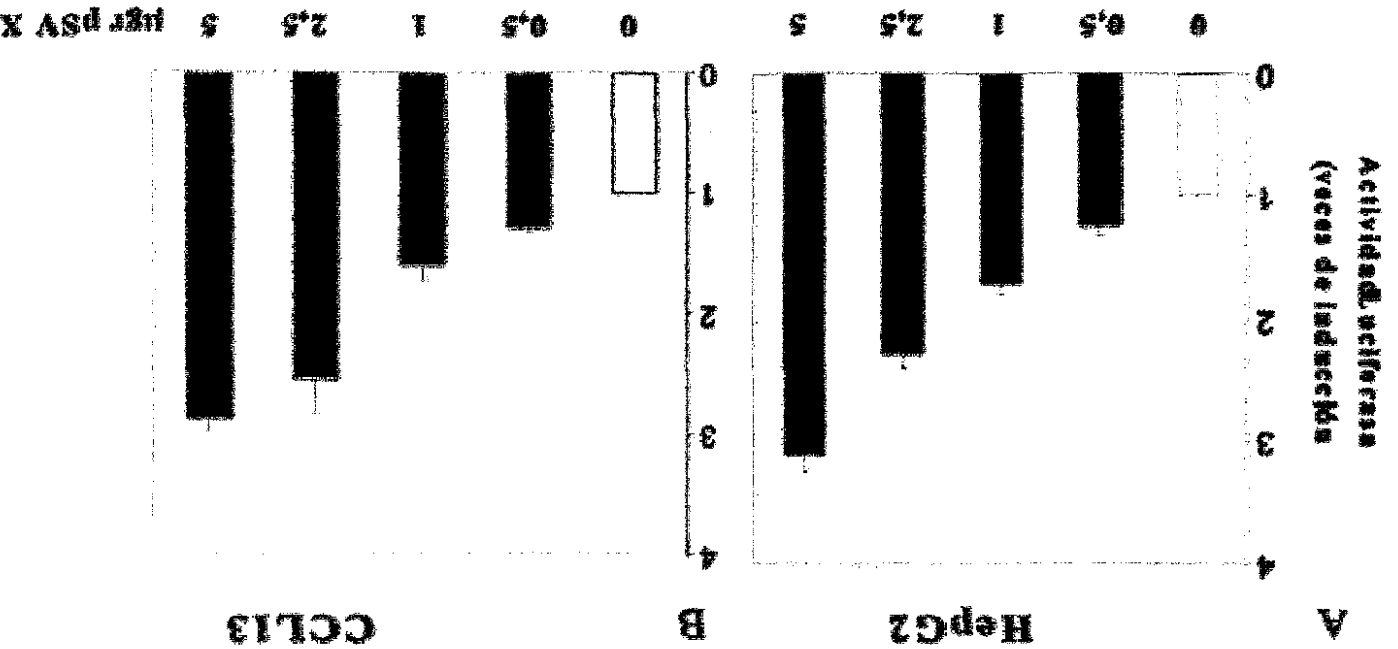
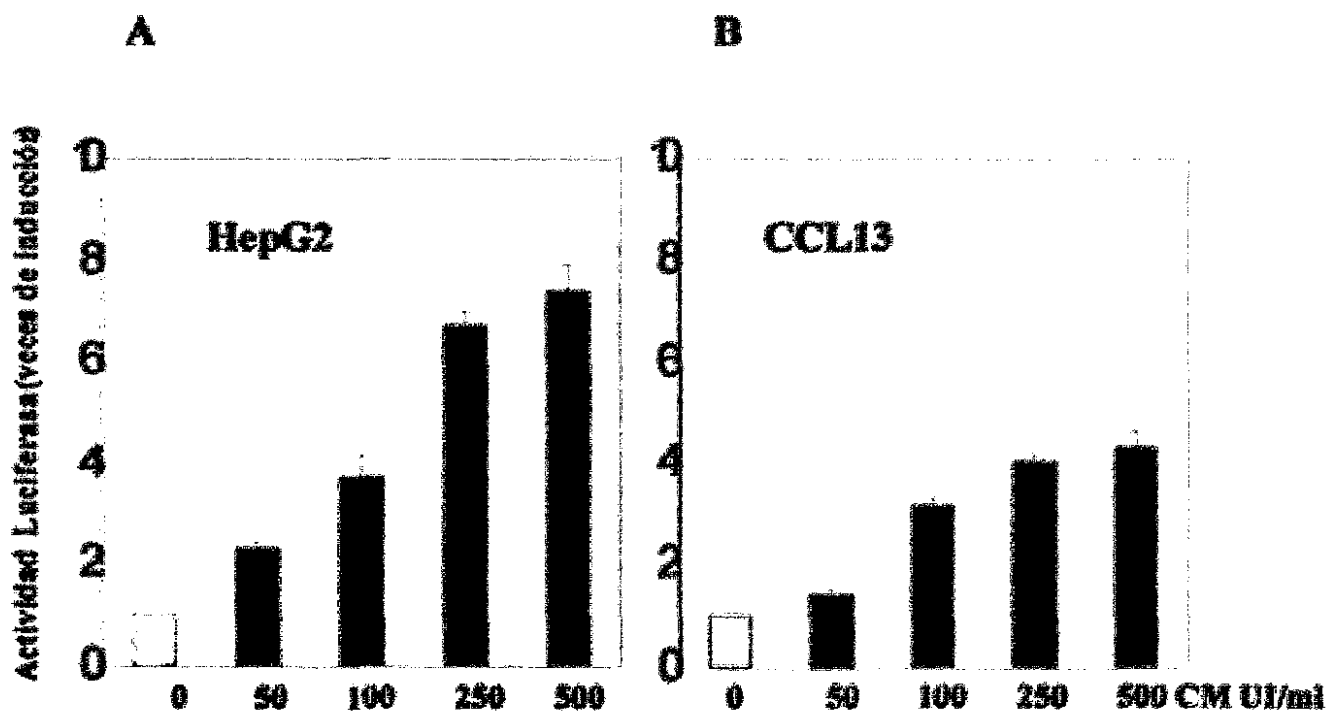


Figura 9. Modulación de la actividad transcripcional del gen de la ONSI por la HBx. El plásmido

reportero pGLNOS 8,3 wt, conteniendo 8,3 kb de la región promotora del gen de la ONSI humana unidos al gen de la luciferasa de *Photinus pyralis*, fue transfectado junto con cantidades crecientes del vector de expresión de la HBx, pSVX. El plásmido pSV-Hygro fue utilizado para mantener constante la cantidad de ADN transfectado en cada punto. Los valores de actividad luciferasa están expresados como veces de inducción respecto los valores obtenidos en ausencia del vector de expresión de HBx. Para normalizar la eficiencia de transfección las células fueron cotransfectadas con el plásmido pRL Null, conteniendo el gen de la luciferasa de *Renilla reniformis* sin ningún elemento promotor y enhancer de la transcripción. Los distintos puntos fueron realizados por triplicado. Los valores están expresados como media ( $\pm$  desviación estándar) de cuatro experimentos independientes. Panel A. Resultados obtenidos en la línea HepG2. Panel B. Datos obtenidos en células CCL13.

### 3.4.2. Efecto de la estimulación con citocinas proinflamatorias sobre la transcripción del gen de la ONSI.

Para determinar si la estimulación con citocinas era capaz de provocar un efecto similar al producido por la HBx, las líneas HepG2 y CCL13 fueron transfectadas con un vector que contiene la región promotora y estimuladas posteriormente con distintas cantidades de citocinas (CM: IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ; 50, 100, 250 y 500 UI/ml de cada citocina).

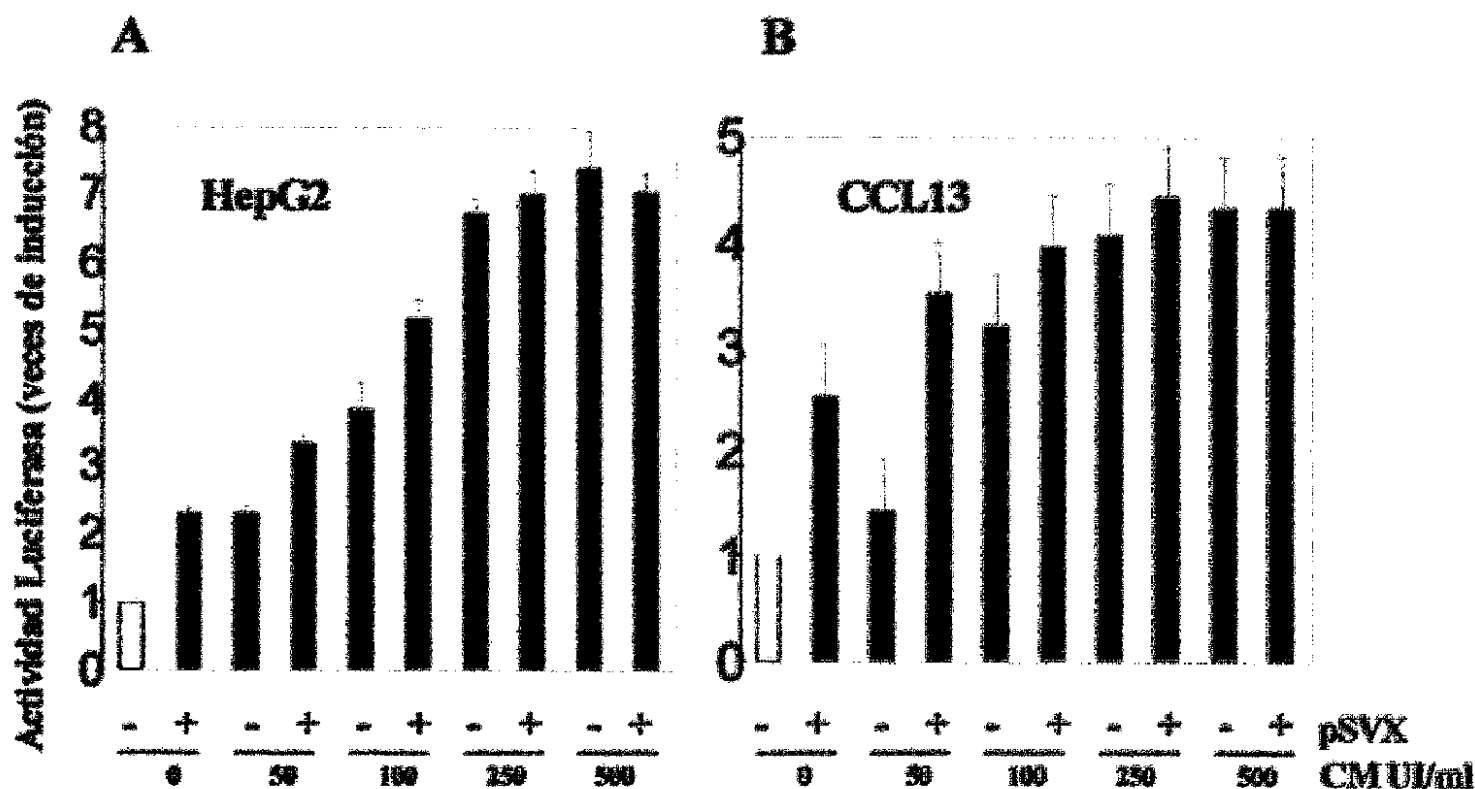


**Figura 10. Modulación de la actividad transcripcional del gen de la ONSI por citocinas proinflamatorias.** El plásmido reportero pGL NOS 8.3 wt fue transfectado y 36 horas después las células se estimularon durante 8 horas con distintas concentraciones de CM (50, 100, 250, 500 UI/ml), tras lo cual se midió la actividad luciferasa. La eficiencia de transfección se normalizó como se ha descrito anteriormente. Los valores están expresados como veces de inducción sobre los valores obtenidos en ausencia de estimulación con citocinas. Los distintos puntos fueron realizados por triplicado. Los valores están expresados como media ( $\pm$  desviación estándar) de cuatro experimentos independientes. Panel A. Resultados en células HepG2. Panel B. CCL13.

La estimulación con CM provocó un incremento de dicha construcción de una manera dosis-dependiente en ambas líneas celulares (Figura 10-Panel A HepG2; Panel B CCL13). Sin embargo, la actividad observada no difería cuando se utilizaron 250 o 500 UI/ml de CM, lo cual sugiere que el mecanismo de activación por CM es saturable. El efecto estimulador no se observó con el vector vacío pGL3Basic (datos no mostrados).

### 3.4.3. Efecto simultáneo de las citocinas proinflamatorias (CM) y la proteína HBx sobre la transcripción del gen de la ONSI.

Con objeto de analizar el efecto conjunto ejercido por la HBx y la mezcla de citocinas (CM) en la regulación de la expresión de la ONSI, las líneas celulares HepG2 y CCL13 se cotransfectaron con el plásmido pGLNOS wt y 2,5  $\mu$ g del vector de expresión de la HBx, estimulándose posteriormente con cantidades crecientes de citocinas.



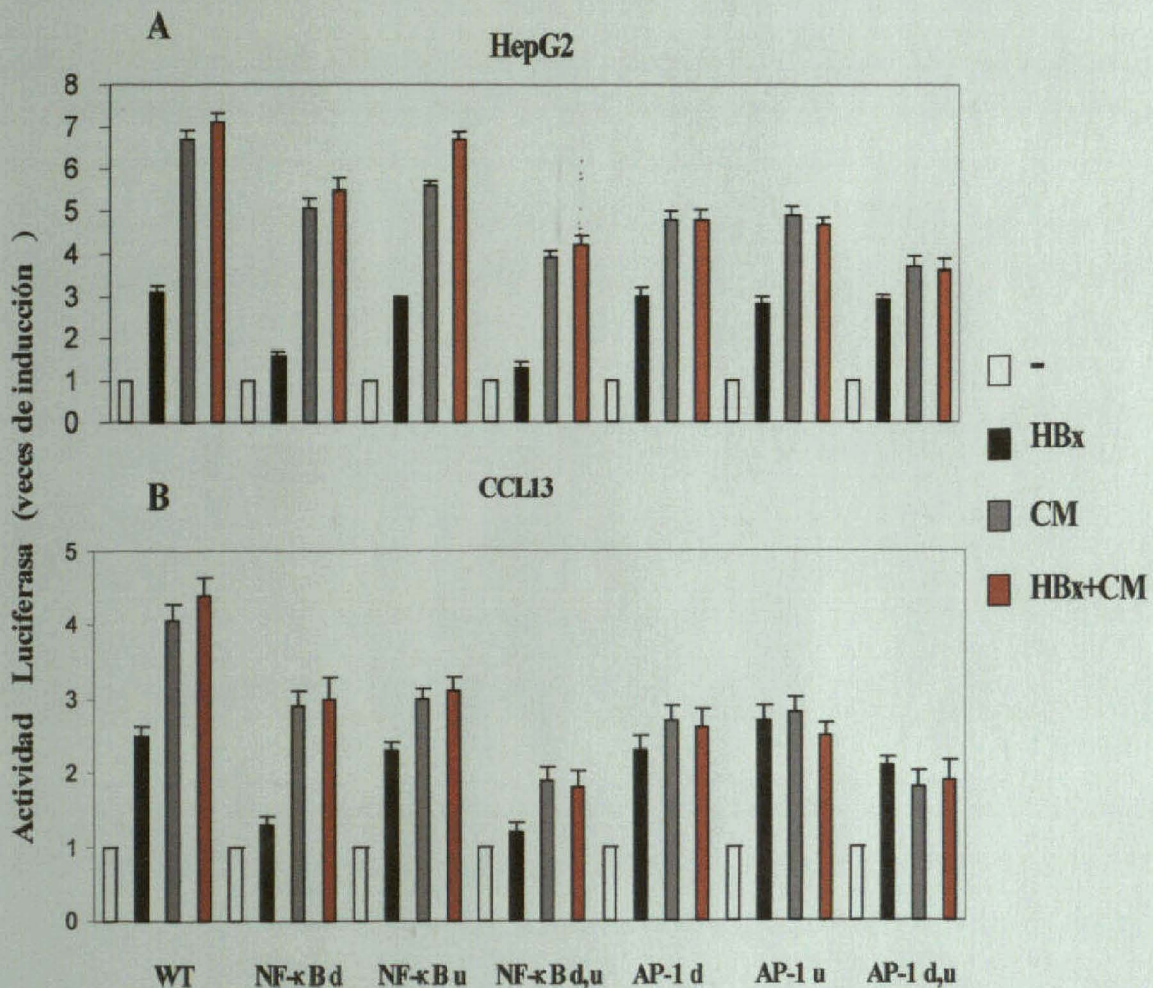
**Figura 11.** Modulación de la actividad transcripcional del gen de la ONSI por el estímulo conjunto de las citocinas proinflamatorias y la proteína HBx. Los plásmido pGL NOS 8.3 wt y pSVX se cotransfectaron y 36 horas después las células fueron estimuladas durante 8 horas con distintas concentraciones de CM (50, 100, 250 y 500 U/ml), tras lo cual se midió la actividad luciferasa. La sustitución de ambos plásmidos por el plásmidos pGL3 Basic y pSV-Hygro se utilizó como control negativo de especificidad. Los valores están expresados como veces de inducción sobre los valores obtenidos en ausencia de ningún estímulo. Los distintos puntos fueron realizados por triplicado. Los valores están expresados como media ( $\pm$ desviación estándar) de cuatro experimentos independientes. Panel A. Resultados obtenidos en células HepG2. Panel B. Datos obtenidos en células CCL13.

Pudimos observar un efecto aditivo entre los dos estímulos cuando se utilizaron cantidades de citocinas que provocaban una estimulación parcial de la actividad (50 o 100 UI/ml) en HepG2 (Figura 11-Panel A) y CCL13 (Panel B). Sin embargo, al utilizar cantidades mayores de CM (250 o 500 UI/ml) este efecto no fue observado y los niveles de ambos estímulos no excedieron a los obtenidos con las concentraciones más elevadas de CM. El efecto estimulador no se observó con el vector vacío (datos no mostrados).

#### **3.4.4. Efecto de las mutaciones puntuales que afectan a sitios de unión para NF- $\kappa$ B y AP-1 en el promotor de la ONSi en la inducción por citocinas proinflamatorias y la proteína HBx sobre la transcripción del gen de la ONSi.**

Para poder determinar la importancia relativa de la mutación en la secuencia de distintos sitios de unión para los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1, se transfectaron una serie de plásmidos conteniendo mutaciones simples o dobles que afectan a sitios de unión para los factores de transcripción NF- $\kappa$ B o AP-1 localizados en la región promotora del gen de la ONSi humana (Marks-Konczalik y cols., 1998). Adicionalmente, las células fueron cotransfectadas con un vector de expresión de la HBx y/o estimuladas con CM durante 8 horas.

Los resultados de estos experimentos mostraron cómo las distintas mutaciones en la secuencia provocaban una reducción parcial de la inducción mediada por la CM (Figura 12), reducción que era mayor aún cuando se transfectaban construcciones con dobles mutaciones (NF- $\kappa$ B d,u y AP-1 d,u). Lo más interesante fue que la respuesta a la HBx sólo se vio significativamente reducida al transfectar las construcciones que contenían mutado el sitio proximal NF- $\kappa$ B localizado en el posición -102 de la región promotora (NF- $\kappa$ B d, NF- $\kappa$ B d,u). La mutación del sitio NF- $\kappa$ B distal (NF- $\kappa$ B u) y de los sitio AP-1 (AP-1d y AP-1u) no provocaron una reducción significativa en la actividad inductora de HBx. La actividad transcripcional de la construcción carente de región promotora no se vio afectada ni por el tratamiento con la CM ni por la transfección con la HBx, indicando que los efectos observados eran específicos de la región promotora de la ONSi (datos no mostrados)



**Figura 12. Efecto de mutaciones puntuales sobre el incremento de la actividad transcripcional del gen de la ONSi mediado por citocinas proinflamatorias y/o la proteína HBx.** Los plásmidos pGL NOS 8.3 wt y los vector pGL NF-κB d, NF-κB u, NF-κB du, AP-1-d, AP-1u y AP-1,du que contienen mutaciones puntuales simples o dobles de los sitios NF-κB o AP-1 localizados en el promotor de la ONSi, fueron transfectados junto al vector pSVX. Treinta y seis horas después las células fueron estimuladas o no con citocinas (250 UI/ml) durante 8 horas, tras lo cual se midió la actividad luciferasa. La sustitución de ambos plásmidos por los plásmidos pGL3 Basic y pSV-Hygro se utilizó como control negativo de especificidad. Los valores de actividad luciferasa, para cada plásmido en particular, están expresados como veces de inducción sobre los valores obtenidos en ausencia de ningún estímulo. Los distintos puntos de los experimentos fueron realizados por triplicado. Los valores están expresados como media ( $\pm$  desviación estándar) de cuatro experimentos independientes. **Panel A.** Resultados obtenidos en la línea HepG2. **Panel B.** Células CCL13.

### 3.4.5. Actividad transcripcional del gen de la ONSI en líneas celulares transfectadas establemente con el VHB y la HBx.

Para determinar si el HBV o la proteína HBx afectaban a la actividad transcripcional del gen de la ONSI en las líneas HepG2 vs 2.2.15 y CMO vs CMX, estas líneas celulares fueron transfectadas con los plásmidos, pGL3 NOS wt y pGL3 NOS NF- $\kappa$ Bd y estimuladas con citocinas durante 8 horas, tras lo cual se analizó la actividad luciferasa. Adicionalmente, como control positivo, se transfectaron con los plásmidos pAPI Pro-Luc y Pro-Luc, conteniendo el promotor mínimo del gen de la prolactina de rata con o sin elementos de respuesta a AP-1 respectivamente.

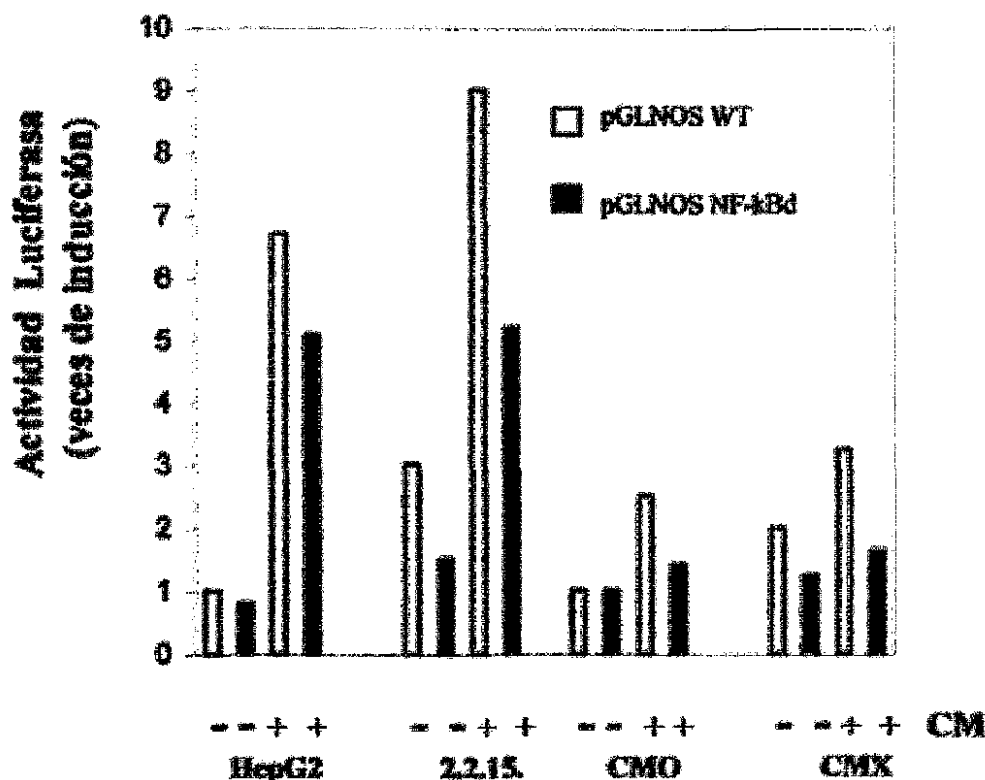


Figura 13. Actividad transcripcional del gen de ONSI en células transfectadas establemente por el VHB o la HBx. Las células se transfectaron con los plásmido pGL NOS 3.3 wt o pGL NOS NF- $\kappa$ B d y 36 horas después fueron estimuladas o no con citocinas durante 8 horas tras lo cual se midió la actividad luciferasa. Los valores están expresados como veces de inducción sobre los valores obtenidos en ausencia de ningún estímulo, y fueron normalizados como se describió anteriormente. Los distintos puntos de los experimentos fueron realizados por triplicado. Los valores son representativos de tres experimentos independientes.

Las células 2.2.15., que expresan el HBV, y las células CMX, que expresan la proteína HBx, presentaban una mayor actividad luciferasa, en comparación con las respectivas células control, cuando se transfectaron con el plásmido pGLNOS wt, tanto a nivel basal como tras la estimulación con CM. De manera relevante, estas diferencias que se vieron significativamente reducidas al utilizar la construcción pGL NOS NF- $\kappa$ B u.

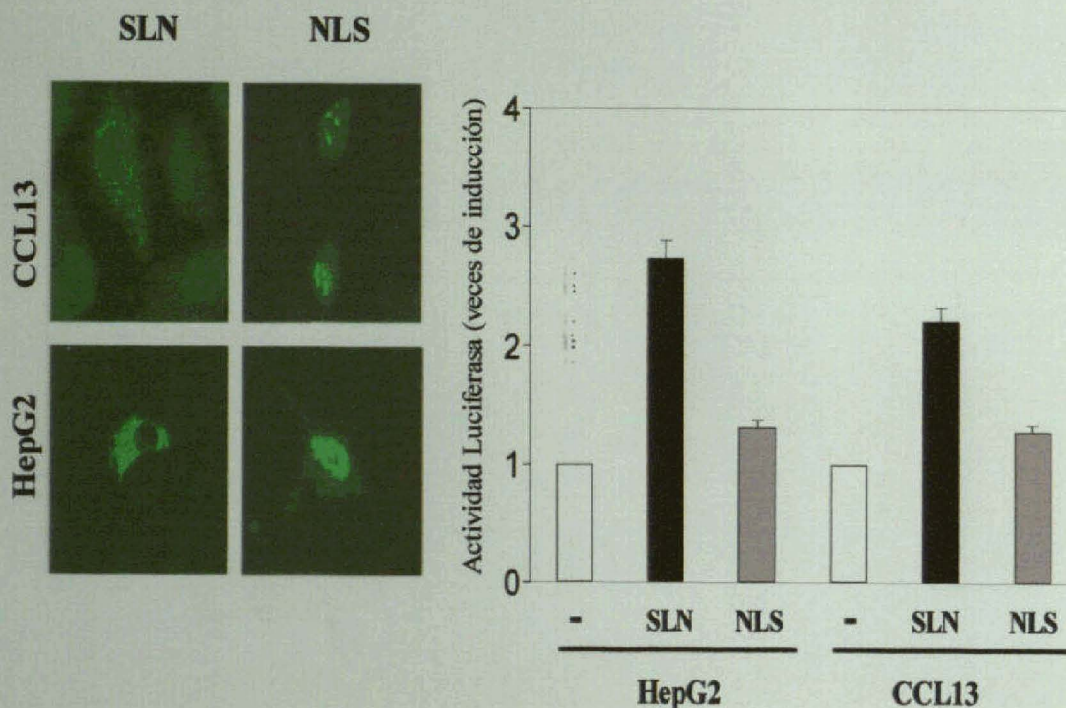


Por otro lado, comprobamos que el plásmido pAP1 Pro-luc presentaba una mayor actividad en 2.2.15 y CMX en comparación con HepG2 y CMO respectivamente. Sin embargo el plásmido pPro-Luc, sin elementos inducibles, presentaba una actividad luciferasa similar en todas las líneas y condiciones estudiadas (datos no mostrados). Estos resultados apoyan la hipótesis que sostiene que el VHB y más concretamente la HBx activarían la transcripción del gen de la ONSi en líneas derivadas de hepatocitos humanos.

#### 3.4.6. Efecto de la localización subcelular de la HBx sobre la transcripción del gen de la ONSi .

La proteína HBx ejerce distintas funciones dependiendo de su localización subcelular (Doria y Schneider; 1995). Para analizar la influencia de la localización de la HBx en el incremento de la actividad transcripcional del gen de la ONSi, las líneas HepG2 y CCL13 fueron transfectadas con los vectores de expresión de HBx pCMV-HBx-NLS y pCMV-HBx-SLN junto con el plásmido pGLNOS wt. El primero permite expresar la HBx en el núcleo, ya que esta proteína está acoplada a una secuencia de localización nuclear, mientras que en el segundo esta secuencia se encuentra inactivada, por lo que se localiza en el citoplasma.

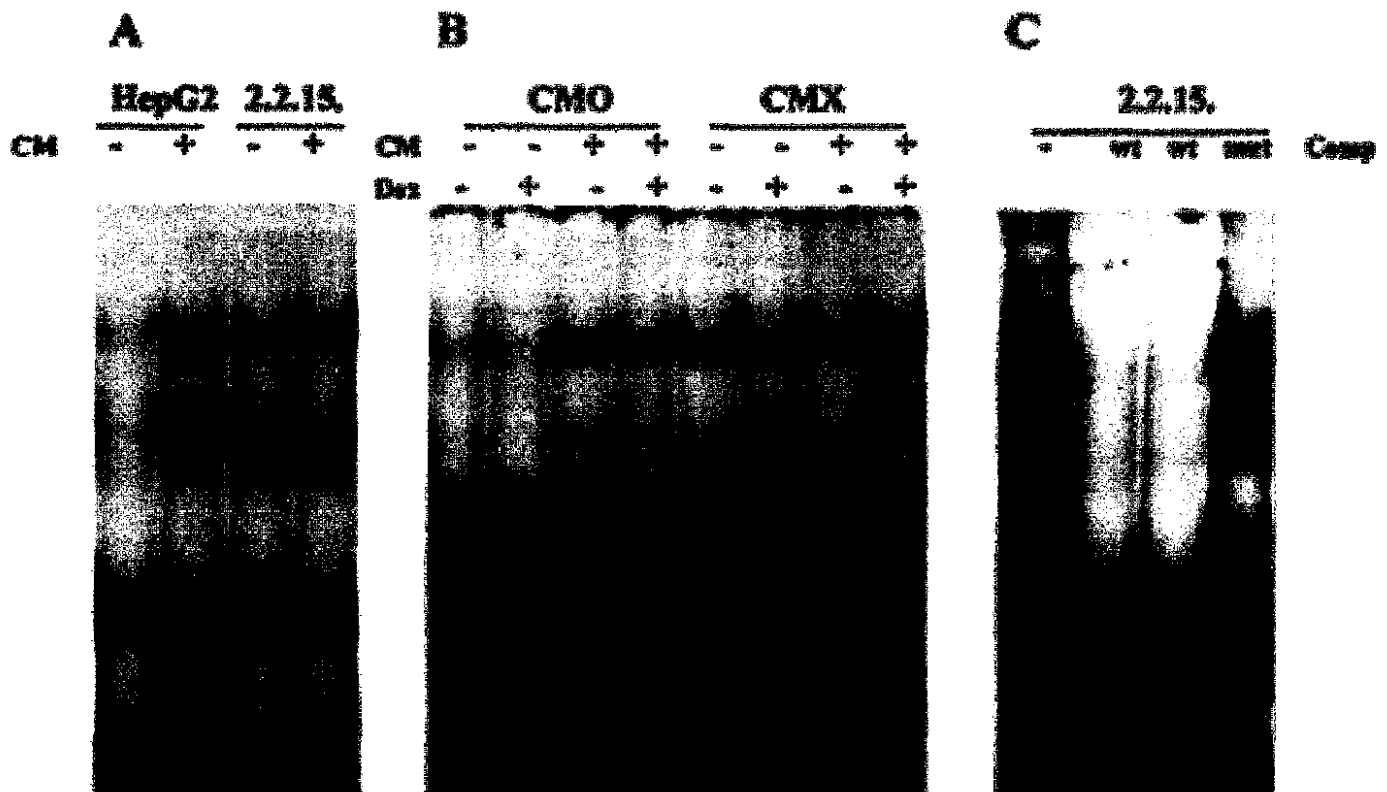
Como primer paso analizamos la localización subcelular de la HBx. Ambos plásmidos generan HBx acoplada a una secuencia adicional (epitopo-Flag) que permite su localización mediante experimentos de inmunofluorescencia indirecta. Esta proteína se localizaba en el citoplasma tras la transfección con el plásmido pCMV-HBx-SLN y preferentemente en el núcleo tras transfección con pCMV-HBx-NLS en ambos tipos celulares (Figura 14-Panel A). Adicionalmente, como control negativo de la técnica de detección por inmunofluorescencia, se utilizó un anticuerpo del mismo isotipo que el anti-Flag utilizado en la detección de la HBx obteniéndose resultados negativos (no mostrado). La actividad luciferasa de la construcción pGLNOS wt se incrementó significativamente cuando las células se transfectaron con la construcción que permite expresar la HBx en el citoplasma (Figura 15- Panel B), mientras que la expresión en el núcleo no alteró significativamente la actividad transcripcional. Estos datos sugieren que el incremento de la actividad transcripcional del gen de la ONSi está asociado a la presencia de esta proteína en el citoplasma.



**Figura 14. Efecto de la localización subcelular de la HBx sobre la activación del promotor de la ONSi.** Las células se transfectaron con el plásmido PGLNOS wt y los plásmidos pCMV-HBx-SLN o pCMV-HBx-NLS. Treinta y seis horas después fueron analizadas tanto la localización de HBx como la actividad luciferasa de la construcción conteniendo el promotor de la ONSi. **Panel A.** Localización de HBx por inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo anti-Flag (1  $\mu$ g/ml). **Panel B.** Efectos de la localización de HBx en la actividad luciferasa de la construcción promotora de ONSi. Los valores de actividad luciferasa están expresados como veces de inducción sobre los valores obtenidos con la transfección del plásmido pECP4 y fueron normalizados como se describió anteriormente. Los distintos puntos de los experimentos fueron realizados por triplicado. Los valores están expresados como media ( $\pm$ desviación estándar) de tres experimentos independientes.

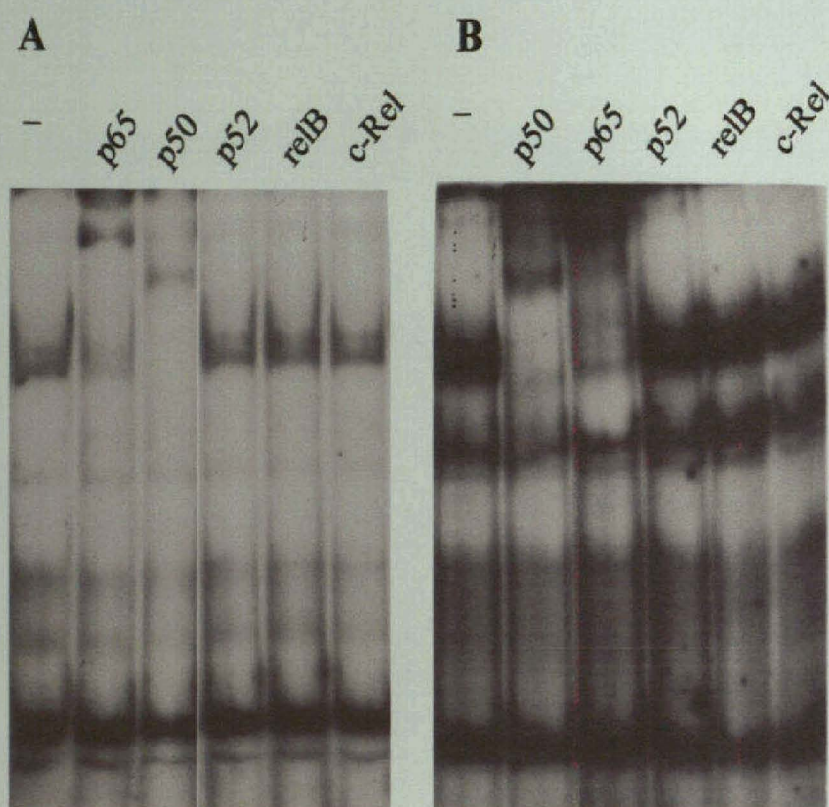
### 3.5. Efecto de la HBx y el VHB sobre la actividad NF- $\kappa$ B.

Con objeto de examinar si el HBV o HBx eran capaces de inducir la unión entre el factor de transcripción NF- $\kappa$ B y un oligonucleótido conteniendo la secuencia del sitio NF- $\kappa$ B localizado en la posición -102 de la región promotora del gen de la ONSi, realizamos experimentos de retardo de la movilidad electroforética. Para ello incubamos extractos nucleares de las células HepG2, 2.2.15, CMO y CMX, estimuladas o no durante 1 hora con la CM, con un oligonucleótido conteniendo el sitio NF- $\kappa$ B anteriormente citado marcado con  $^{32}$ P. Adicionalmente, las células CMO y CMX fueron preincubadas o no con Dex durante 16 horas previamente a la estimulación con citocinas.



**Figura 14. Efecto mediado por el VHB y la proteína HBx sobre la aparición de complejos ADN-NF-κB.** Se realizaron ensayos de retardo de la movilidad electroforética, utilizando extractos nucleares de los distintos tipos celulares tras 1 hora de estimulación con CM junto con un oligonucleótido conteniendo el sitio de unión a ADN de NF-κB localizado en la posición -102 del promotor de la ONSi humana marcado con  $^{32}\text{P}$ . Donde se indica, las células CMO y CMX fueron incubadas con Dex durante 16 horas previamente a la estimulación con CM. **Panel A.** Ensayos en células HepG2 y 2.2.15. **Panel B.** Ensayos en células CMO y CMX. **Panel C.** Para ensayos de competición se utilizaron extractos nucleares de células 2.2.15, estimuladas con CM y un exceso de 40 y 130 veces del mismo oligonucleótido no marcado y un oligonucleótido marcado conteniendo la secuencia mutada.

En resumen, en células no estimuladas los niveles nucleares de NF-κB eran menores en HepG2 en comparación con 2.2.15 (Figura 14-Panel A). En ambas líneas los niveles se indujeron tras la estimulación con la CM pero los máximos niveles se detectaron en 2.2.15, estimuladas. En la línea celular CMO, los niveles también aumentaron tras la estimulación con la CM y el pretratamiento con Dex provocó una reducción de los mismos. Sin embargo, en la línea CMX los niveles nucleares de NFκB, independientemente del tratamiento con dexametasona o citocinas, eran mayores en comparación con los detectados en CMO (Figura 4-Panel B). La especificidad de los complejos detectados se determinó utilizando un exceso del oligonucleótido NF-κB -102 no marcado y un oligonucleótido marcado conteniendo el sitio NF-κB mutado (Figura 14-Panel C).



**Figura 15. Identificación de los miembros de la familia NF- $\kappa$ B unidos al sitio NF- $\kappa$ B localizado en posición -102 del promotor de la ONSi.** Antes de añadir el oligonucleótido marcado, los extractos nucleares se incubaron anticuerpos anti p50, p65, p52, Rel-B y c-Rel (1 $\mu$ g). **Panel A.** Experimentos con extractos nucleares de células 2.2.15, estimuladas. **Panel B.** Células CMX no preincubadas con Dex y estimuladas con CM.

Finalmente, con objeto de caracterizar los miembros de la familia de NF- $\kappa$ B que participaban en los complejos detectados, se utilizaron anticuerpos específicos frente a los distintos miembros de la familia de NF- $\kappa$ B (anti p-50, p-65, p-52, Rel B y C-Rel.). Los datos de estos experimentos demostraron que los complejos inducidos tanto por el HBV y por la HBx junto con las citocinas proinflamatorias, estaban formados que las proteínas p50 y RelA/p65 (Figura 15-Panel A: células 2.2.15, estimuladas; Panel B: células CMX, estimuladas o no con CM).

#### **4. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA ONSI POR LA AdoMet.**

##### **4.1. Efecto de la AdoMet sobre la expresión hepática de la ONSi en ratas tratadas con lipopolisacárido bacteriano.**

La AdoMet ha sido utilizada con eficacia en el tratamiento frente una gran variedad de agentes que provocan daño hepático, sin embargo, los mecanismos que median este efecto hepatoprotector no son totalmente conocidos (Mato y cols., 1997). En modelos de shock séptico en ratas se ha demostrado que la AdoMet es capaz de modular negativamente la expresión de factores implicados en la inducción de la ONSi, como TNF- $\alpha$  (Watson y cols., 1999), por lo que decidimos determinar el efecto de la AdoMet sobre la expresión de este enzima. Para ello, se inyectó intraperitonealmente LPS (15 mg/kg de peso, disuelto en solución salina) en ratas con o sin pretratamiento con AdoMet (10 mgr/kg de peso, disuelto en solución salina; dos dosis la primera dosis se administró 30 min antes y la segunda 3 horas después de la administración de LPS). Tras 6 horas del tratamiento con LPS se analizaron los niveles intrahepáticos de ONSi por western blot.

No se detectó expresión de la ONSi en el tejido hepático de ratas controles, inyectadas únicamente con suero salino o con AdoMet, que sin embargo sí fue detectada tras la administración de LPS. Un hallazgo interesante fue que el pretratamiento con AdoMet provocó una reducción en los niveles intrahepáticos de ONSi en ratas tratadas con LPS (Figura 16. Panel A, superior). El análisis de los niveles de  $\beta$ -actina sirvió como control en nuestros experimentos (Figura 16-Panel A, inferior).

Adicionalmente, para determinar si este efecto se veía reflejado en la actividad enzimática de la ONSi medimos los niveles séricos de ON. Los datos mostraron que el incremento de los niveles de ON observado tras el tratamiento con LPS también se reducía parcialmente tras el tratamiento con AdoMet (Figura 16-Panel B)

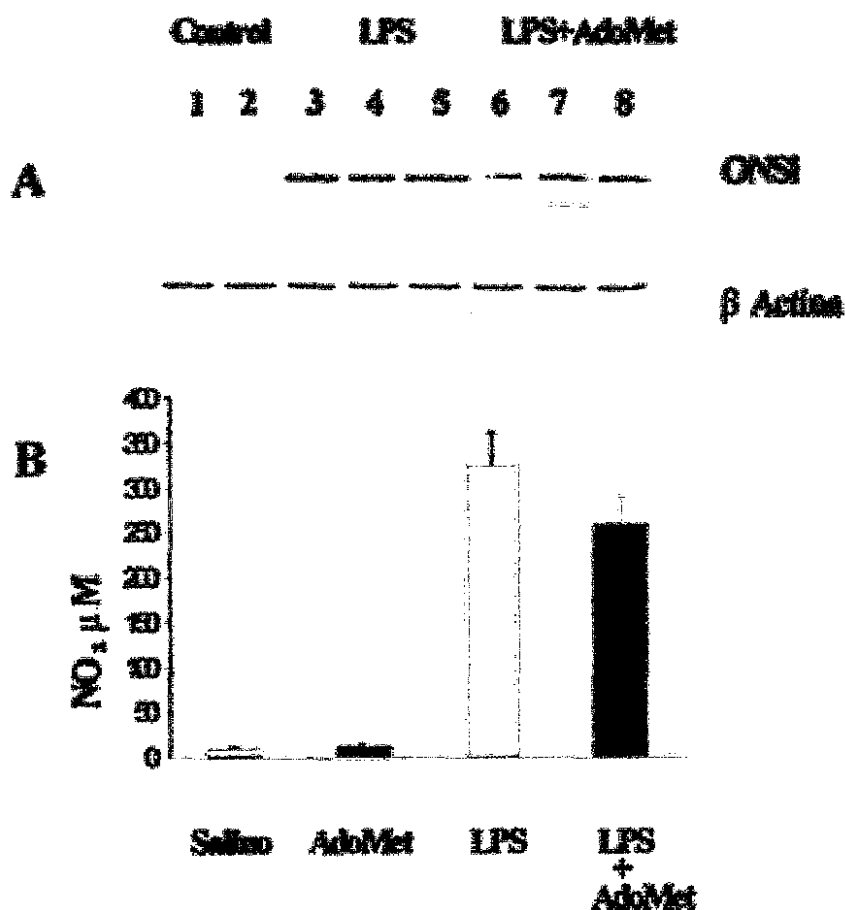


Figura 16. Efecto de la AdoMet sobre el incremento en la expresión intrahepática de ONSi y en los niveles séricos de ON inducidos por la administración de LPS en ratas. Los animales fueron inyectados con LPS intraperitonealmente (15 mg/Kg), y 6 horas después se extrajeron el suero y el hígado. Adicionalmente, un grupo de animales fueron tratados con AdoMet (10 mg/kg; 2 inyecciones, la primera 30 minutos antes y una segunda 3 horas después de la administración del LPS). Como controles, un grupo de ratas fueron tratadas únicamente con AdoMet o con suero salino. Panel A. Análisis por western blot de los niveles intrahepáticos de ONSi (parte superior) y β-actina (inferior). Los datos son representativos de 2 experimentos independientes, realizados con tres animales en los grupos tratados con LPS y LPS+AdoMet, y dos en los controles. Panel B. Niveles séricos de ON, expresados como μM ON media (±desviación estándar)

#### 4.2. Efecto de la AdoMet sobre la expresión de la ONSi en hepatocitos de rata.

##### 4.2.1. Efecto sobre los niveles de ARNm y proteínas de la ONSi.

Para determinar si los efectos de la AdoMet sobre la expresión de la ONSi "in vivo" podían ser reproducidos "in vitro", se incubaron cultivos primarios de hepatocitos de rata con una combinación de citocinas proinflamatorias (TNF-α, IL-1β e IFN-γ; 100 UI/ml de cada una de ellas), preincubándose 30 minutos antes con distintas concentraciones de AdoMet (0,1, 0,5 1 y 2 mM). El ARN y las proteínas celulares fueron extraídos tras estimulación con la mezcla de citocinas proinflamatorias durante 3 y 6 horas, respectivamente.

En consonancia con trabajos anteriores que habían puesto de manifiesto que el método de aislamiento de los hepatocitos inducía la expresión de la ONSi (Wang y cols., 1998), nuestros experimentos demostraron que la ONSi era expresada, tanto a nivel de ARNm (Figura 17-Panel A) como de proteína (Figura 17-Panel B), en células sin estimular y que sus niveles se incrementaban tras la estimulación con CM. De manera relevante, el pretratamiento de los hepatocitos con AdoMet provocó una reducción, dosis-dependiente, en los niveles de ONSi detectados tanto en hepatocitos estimulados con CM (carriles 7-10) como no

estimulados (carriles 2-5). El análisis de los niveles de  $\beta$ -actina sirvió como control en nuestros experimentos

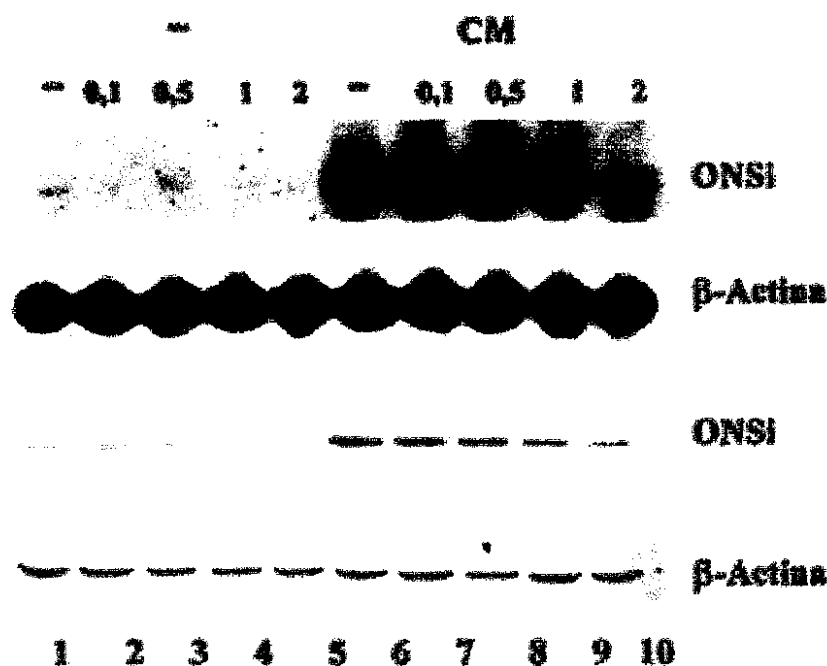
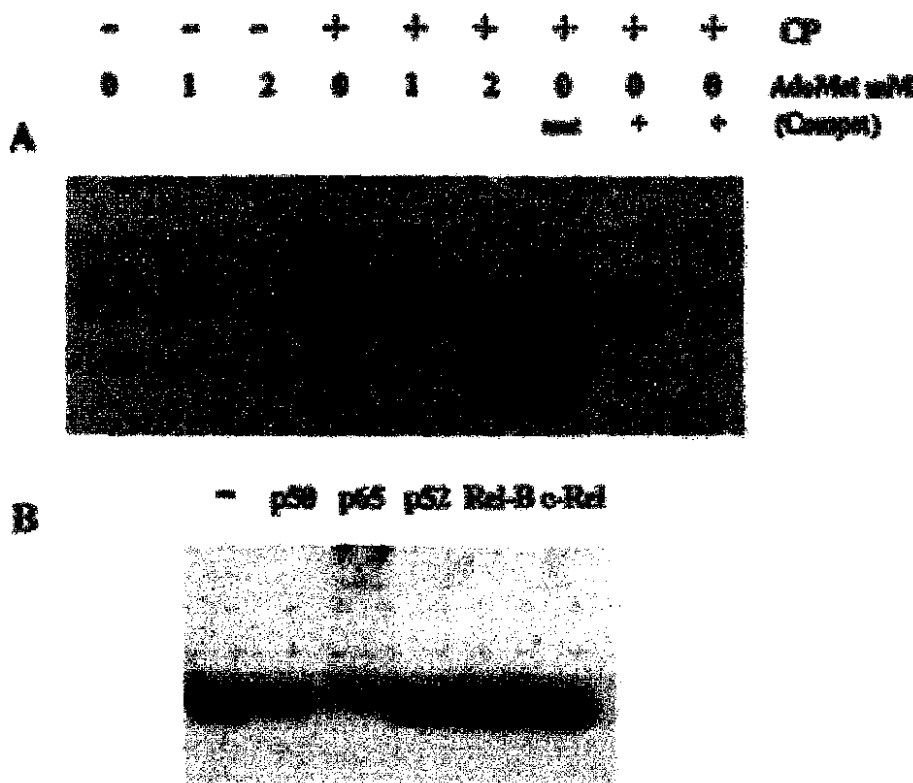


Figura 17. Efecto de la AdoMet sobre los niveles de la ONSi en cultivos primarios de hepatocitos de rata. Los hepatocitos fueron tratados o no con CM (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ , 100 U/ml cada una). Adicionalmente, se pretrataron o no con concentraciones crecientes de AdoMet (0.1, 0.5, 1 y 2 mM) 30 minutos antes de la estimulación. Panel A. Análisis por northern blot de los niveles de ARNm de la ONSi tras 3 horas de estimulación (parte superior). Análisis de los niveles de  $\beta$ -actina (inferior). Panel B. Análisis por western blot de los niveles de proteína de ONSi tras 6 horas de estimulación (parte superior). Niveles de  $\beta$ -actina (inferior). Los datos presentados son representativos de 4 experimentos independientes.

## 2.2. Efecto de la AdoMet sobre la activación de NF- $\kappa$ B.

Dado que NF- $\kappa$ B está implicado en el control de la expresión de ONSi en distintos tipos celulares (Nathan y cols., 1994b), decidimos analizar el efecto de la AdoMet sobre la activación de este factor de transcripción en cultivos primarios de hepatocitos de rata mediante ensayos de retardo de la movilidad electroforética. Los extractos nucleares de los hepatocitos de rata, pretratarados o no con AdoMet, se incubaron con un oligonucleótico que contenía un sitio consenso de unión para NF- $\kappa$ B marcado con  $^{32}$ P.

De acuerdo con publicaciones previas (Rodríguez-Ariza y Paine, 1999), observamos NF- $\kappa$ B en extractos nucleares de células no estimuladas (Figura 18. Panel A, carril 1), cuyos niveles aumentaron tras el tratamiento con citocinas (carril 4). El pretratamiento con AdoMet provocó una reducción en la intensidad de los complejos tanto en células no estimuladas (carriles 2-3) como estimuladas (carriles 5-6).



**Figura 18.** Efecto de la AdoMet sobre la formación de complejos NF-κB-ADN. Los extractos nucleares fueron obtenidos de hepatocitos estimulados o no con CM (TNF-α, IL-1β IFN-γ; 100 UI/ml cada una) durante 1 hora. Adicionalmente, fueron pretratados o no con de AdoMet (1 y 2 mM) 30 minutos antes de la estimulación. **Panel A.** Los extractos nucleares se incubaron con un oligonucleótido marcado con <sup>32</sup>P conteniendo un sitio consenso de unión de NF-κB. Para los estudios de competición se utilizó un exceso de 25- y 50- molar del mismo oligonucleótido no marcado. **Panel B.** Para identificar los miembros de la familia de NF-κB implicados, los extractos nucleares se incubaron con 0,5 μl de anticuerpos anti-p50, p65, p52, c-Rel y Rel-B antes de añadir la sonda marcada con el oligonucleótido consenso NF-κB. Los datos presentados son representativos de 4 experimentos independientes.

La especificidad de los complejos se determinó utilizando un exceso de nucleótido no marcado que provocó una desaparición de la señal (Figura 18-Panel A, carriles 8-9) y un exceso de oligo mutado que no provocó una reducción en los complejos (carril 7). Con objeto de caracterizar los complejos nucleares NF-κB-ADN se utilizó un panel de anticuerpos frente a los distintos miembros de la familia NF-κB (Figura 18-Panel B). La preincubación de los extractos nucleares con anticuerpos frente a p50, p65 provocó una disminución de la señal detectada (Figura 18- Panel B), mientras que anticuerpos frente a p52, Rel B o c-Rel no provocó ninguna modificación.

**4.2.3. Efecto de AdoMet sobre los niveles de proteína de los inhibidores de NF-κB IκB α y IκB β.**

La translocación de los complejos NF-κB/Rel son regulados por una familia de proteínas inhibitoras conocidas como IκB (Baldwin, 1996). Para determinar si el tratamiento con la AdoMet afectaba a estas proteínas, se analizaron los niveles de IκB α e IκB β por western blot, tanto a nivel basal como tras la estimulación con citocinas durante diferentes tiempos, en hepatocitos pretratados o no con 2 mM de AdoMet.



Como puede observarse en la figura 19, el pretratamiento con AdoMet indujo un aumento en los niveles basales de IκBα en células no estimuladas (Figura 19-carriles 1 vs 2-5, superior). Adicionalmente, se observó la desaparición de IκB tras la estimulación con la CM durante 30 minutos y a partir de ese tiempo de estimulación se observó un incremento gradual en dichos niveles (carriles 6, 8, 10, 12, 14, 16). Un hecho interesante fue que, aunque el pretratamiento de los hepatocitos con la AdoMet no evitó la degradación de IκBα (carril 9), promovió un proceso de resíntesis más rápido en comparación con lo observado en ausencia de AdoMet (carriles 7, 9, 11, 13, 15, 17). Adicionalmente, el pretratamiento con AdoMet evitó la degradación parcial de IκBβ provocada por la estimulación con CM (Figura 19-carriles 1 vs 2-5, inferior)

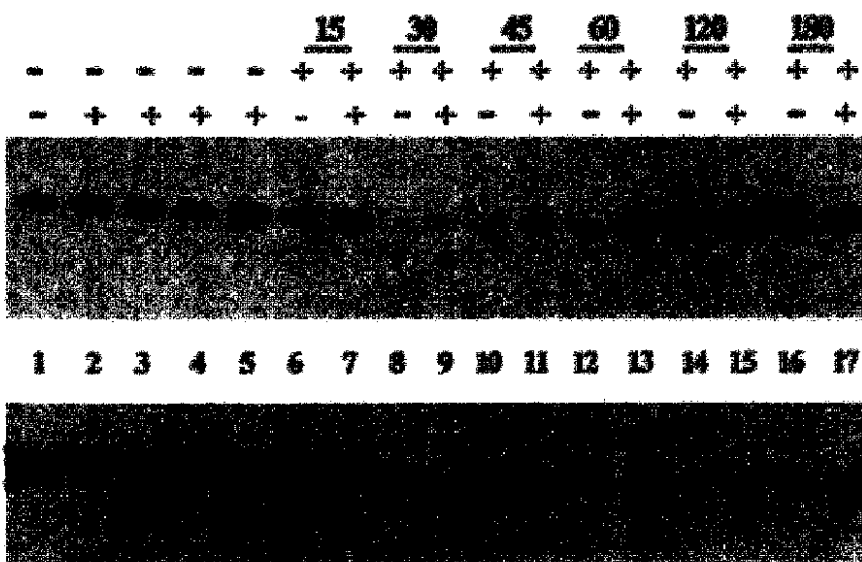


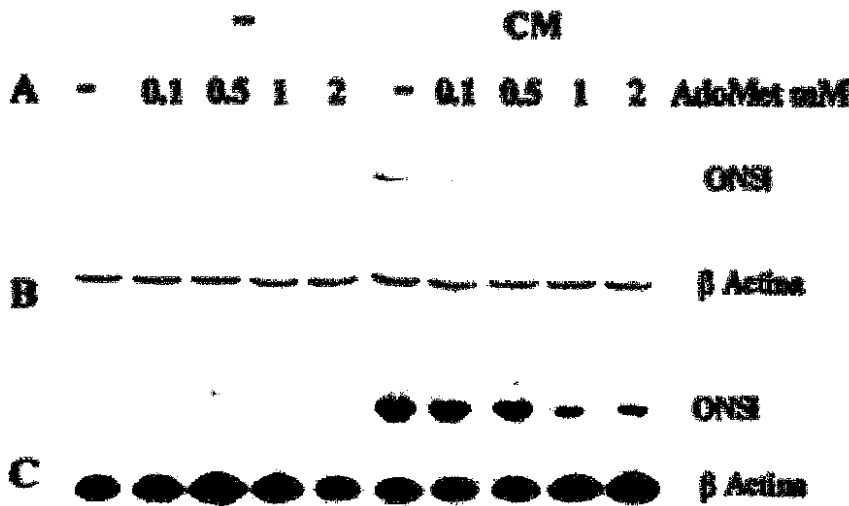
Figura 19. Efecto de AdoMet sobre los niveles de expresión de las proteínas IκB α y β. Los hepatocitos de rata fueron pretratados o no con 2 mM de AdoMet durante 30 minutos antes de la estimulación con la CM. Las proteínas celulares fueron extraídas tras distintos tiempos de estimulación con CM y analizadas por western blot (Ac p; Anti IκB α y β, ambos a 0,5 μg/ml). Superior. Niveles de IκB α. Inferior. Niveles de IκB β. Los datos mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

**4.3. Efecto de la AdoMet sobre la expresión de la ONSi en líneas celulares derivadas de hepatocitos humanos.**

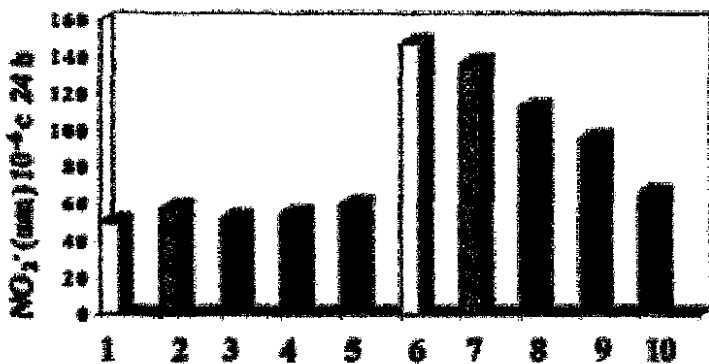
Finalmente, con objeto de caracterizar los efectos de la AdoMet sobre la inducción de ONSi en líneas derivadas de hepatocitos humanos, la línea celular HepG2 fue estimulada con citocinas proinflamatorias, habiendo sido pretratadas o no con distintas concentraciones de AdoMet. Tras 4 y 24 horas de estimulación se analizaron los niveles de expresión de la ONSi, tanto a nivel de ARNm como proteína, así como los niveles de nitritos acumulados en los sobrenadantes celulares.

No se detectó expresión de ONSi en la células no estimuladas, ni a nivel de RNAm (Figura 20. Panel A) ni de proteína (Panel B), induciéndose su expresión tras estimulación

con citocinas. El pretratamiento con AdoMet provocó una reducción dosis-dependiente en los niveles alcanzados tras la estimulación. Se observó un efecto similar de la AdoMet sobre los niveles de nitritos (Panel C).

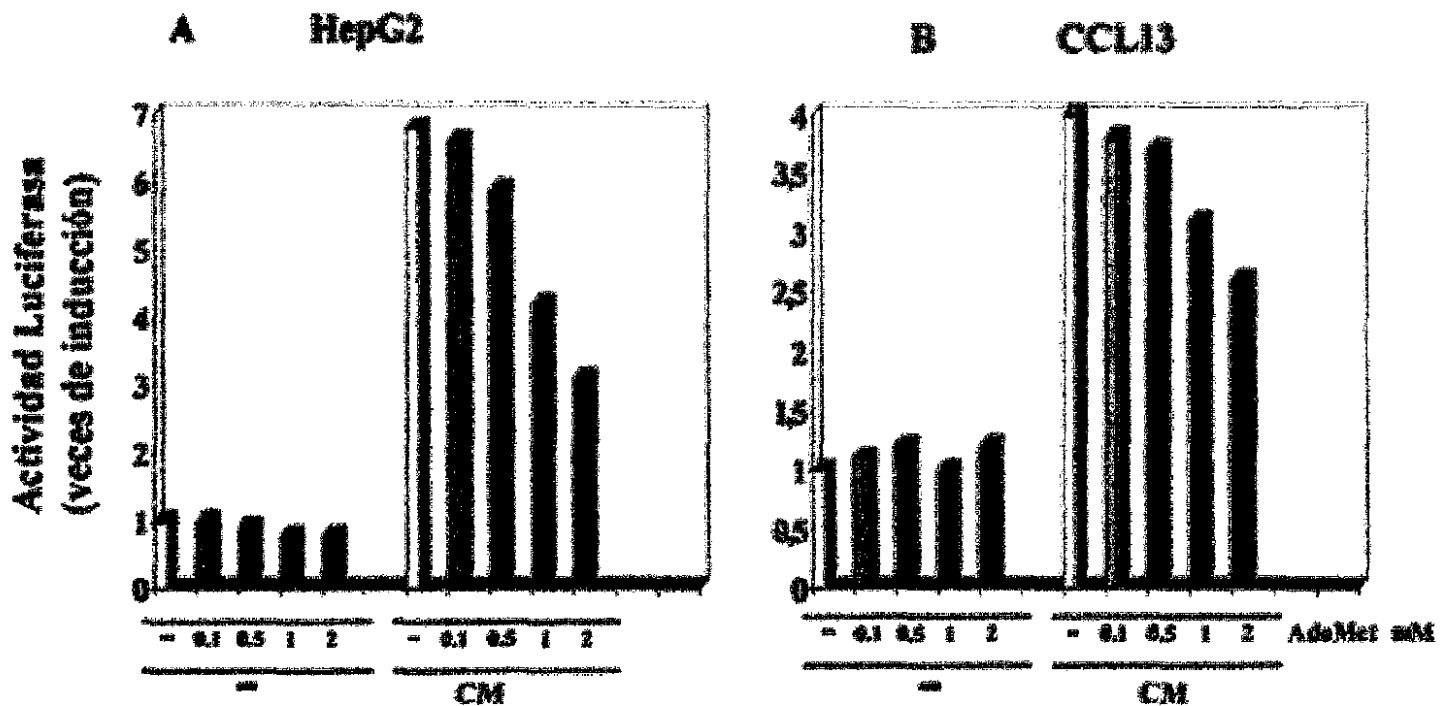


**Figura 20.** Efecto de la AdoMet sobre la expresión y la actividad enzimática de la ONSi en líneas derivadas de he-patoцитos humanos. Las células HepG2 fueron tratadas o no con CM (TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , e IFN- $\gamma$ ; 250 UI/ml cada una). Adicionalmente, se trataron o no con concentraciones crecientes de AdoMet (0.1, 0.5, 1 y 2 mM) 30 minutos antes de la estimulación. Panel A. Análisis por western blot de los niveles de proteína de la ONSi tras 24 horas de estimulación con CM (parte superior). Niveles de  $\beta$ -actina (inferior). Panel B. Análisis por northern blot de los niveles de ARNm 4 horas de estimulación (parte superior). Análisis de los niveles de  $\beta$ -actina (parte inferior). Panel C. Niveles de nitritos en los sobrenadantes celulares tras 24 horas de estimulación. Los datos presentados son representativos de 4 experimentos independientes.



Para comprobar si el efecto inhibitor de la AdoMet podía estar mediado a nivel transcripcional, las células HepG2 y CCL13 se transfectaron con el plásmido pGLNOS 8.3 wt y 36 horas despues se estimularon o no con la CM durante 8 horas, habiendo sido o no pretratadas con distintas concentraciones de AdoMet, tras lo cual se midió la actividad luciferasa.

La AdoMet redujo de manera dosis-dependiente la actividad transcripcional de las construcciones que contenían el gen de la ONSi humana, por lo que podemos deducir que AdoMet es capaz de modular la expresión de la ONSi actuando, al menos parcialmente, a nivel transcripcional



**Figura 21.** Efecto de la AdoMet sobre de la actividad transcripcional del gen de la ONSI en líneas derivadas de hepatocitos humanos. Las líneas celulares HepG2 y CCL13, transfectadas con el plásmido pGLNOS wt, fueron estimuladas o no con CM (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IFN- $\gamma$ ; 250 UI/ml de cada una) durante 8 horas. Adicionalmente, fueron pretratadas o no con concentraciones crecientes de AdoMet (0.1, 0.5, 1 y 2 mM) 30 minutos antes de la estimulación. Panel A. Células HepG2 Panel B. Células CCL13. La actividad luciferasa está presentada como veces de inducción respecto al valor obtenido sin ningún estímulo. Para normalizar la eficiencia de transfección las células fueron cotransfectadas con el plásmido pRL Null, que contiene el gen de la luciferasa de *Renilla reniformis* sin ningún elemento promotor o enhancer de la transcripción. Los distintos puntos de los experimentos fueron realizados por triplicado. Los valores mostrados son representativos de 4 experimentos independientes.

***DISCUSION***

## DISCUSION

### 1. Incremento de la expresión de la ONSi en la HCV. Papel de la infección vírica.

Uno de los hallazgos más relevantes de este estudio fue la demostración de la existencia de un elevado nivel de expresión de la enzima ONSi, tanto a nivel de ARNm como de proteína, en el tejido hepático de pacientes con HCV. Además, se determinó que la expresión era comparativamente mucho menor en hepatopatías de etiología no vírica y prácticamente indetectable en hígados histológicamente normales. Estos datos, junto con el hecho de que en pacientes con HCV el nivel de expresión de la ONSi es independiente del grado de actividad inflamatoria, sugieren que la infección vírica puede jugar un papel importante en la regulación de la expresión hepatocelular de la ONSi en estas patologías (Majano y cols., 1998). Apoyando esta línea de argumentación que sugiere que la infección vírica podría jugar un papel directo en el incremento de la expresión de la ONSi durante la HCV, se ha descrito que existe una intensa expresión de esta enzima directamente relacionada con la carga vírica y no con la actividad inflamatoria en la HC por VHC (Milm y cols., 1997).

Los estudios "in vitro" demostraron que el VHB es capaz de inducir la expresión de la ONSi en células derivadas de hepatocitos humanos, alcanzándose los máximos niveles de esta enzima en células transfectadas con este virus y además estimuladas con citocinas proinflamatorias (Majano y cols., 1998). Este efecto sinérgico podría ser también operativo "in vivo", ya que en la HCV existe un incremento tanto a nivel sérico (Tilgs y cols., 1992) como intrahepático de dichas citocinas. A nivel tisular las citocinas proinflamatorias pueden ser producidas tanto por células activadas del sistema inmune que infiltran el hígado de estos pacientes (García Monzón y cols., 1990; Hata y cols., 1992) como por los hepatocitos infectados (González Amaro y cols., 1994).

La proteína HBx del VHB tiene capacidad para inducir la expresión de un gran número de genes. Uno de los mecanismos propuestos para mediar este efecto está basado en la capacidad de la HBx para modificar la actividad de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP-1 (Murakami, 1999). Recientemente, se ha demostrado que estos factores están implicados en la inducción transcripcional mediada por citocinas proinflamatorias del gen de la ONSi (Marks-Konczalik y cols., 1998; Taylor y cols., 1998). A pesar de que previamente se describió que esta proteína era capaz de inducir la actividad transcripcional del gen de la ONSi en el contexto de un promotor de únicamente 1 kB de tamaño (Amaro y cols., 1999),

nuestros datos muestran como la HBx es capaz de inducir la expresión de ONSi a nivel transcripcional en el contexto de un promotor de 8.3 kB, conteniendo los elementos de respuesta a citocinas, y que también es capaz de cooperar con citocinas proinflamatorias en dicha inducción (Majano y cols., 1998, Majano y cols., 2001 a. sometido). Además, nuestros datos muestran como la proteína HBx actúa, al menos parcialmente, a través del incremento de la actividad del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, ya que la mutación de la secuencia del sitio de unión NF- $\kappa$ B, localizado en la posición -102 del promotor de la ONSi, provoca una reducción considerable en el efecto inductor de la HBx. La expresión de la HBx promueve además la interacción de los miembros de la familia de NF- $\kappa$ B p50 y p65 con dicho elemento de respuesta NF- $\kappa$ B. Además, demostramos que el efecto transactivador de la HBx está asociado a la presencia de esta proteína en el citoplasma. En el caso particular de NF- $\kappa$ B, parece que HBx actúa a nivel de los inhibidores I $\kappa$ B $\alpha$  y p-105 (Su y Schneider, 1996); HBx interacciona con I $\kappa$ B $\alpha$  y es capaz de translocar esta proteína al núcleo, interfiriendo así con su exportación al citoplasma y su asociación a heterodímeros p50/p65, lo que provoca una activación prolongada de NF- $\kappa$ B que, al no poderse unir a su inhibidor, permanece en el núcleo (Weil y cols., 1999).

En células humanas la expresión de la ONSi puede ser regulada a distintos niveles (Geller y Billiar, 1998, Rao, 2000). Nuestros datos muestran cómo en células transfectadas establemente con el genoma completo del VHB se observa un efecto sinérgico entre éste y las citocinas proinflamatorias en la inducción del gen de la ONSi, mientras que en las transfectadas con la proteína HBx el efecto es cooperativo, pero en ningún caso sinérgico, por lo cual es posible que el VHB puede estar aportando algún factor adicional que afecte a la expresión de ONSi. En este sentido, se ha descrito que otras proteínas del VHB como las codificadas por el gen preS2 tienen capacidad de regular la expresión génica. Este gen codifica las tres isoformas del HBsAg (grande, mediana y pequeña) (Kekulé y cols., 1990, Hildt y cols., 1993). En ocasiones la integración del genoma vírico provoca una delección del extremo 3' terminal de esta región generándose una forma truncada del HBsAg mediana capaz de inducir la transcripción de genes a través de la activación de NF- $\kappa$ B (Meyer y cols., 1993). La primera evidencia de que la infección por hepadnavirus juega un papel relevante en la inducción de la ONSi se estableció en experimentos con marmotas infectadas crónicamente con el virus de la hepatitis de marmotas donde se observó un incremento en la síntesis de ON y en la acumulación de compuestos asociados a la actividad de las ONS con capacidad carcinogénica (Lui y cols., 1991 y 1992). Posteriormente, los mismos autores demostraron

cómo el HBsAg de este virus es capaz de inducir la expresión de ONSi en hepatocitos en cultivo (Lui y cols., 1994). En el caso del VHC las proteínas del core y las no estructurales NS5A y B tienen capacidad transactivadora y son capaces de controlar la expresión de genes reporteros con motivos de respuesta tanto para NF- $\kappa$ B como para AP-1 (Kato y cols., 2000). En estudios preliminares llevados a cabo en nuestro grupo, en un sistema de transfectantes estables de líneas derivadas de hepatocitos humanos, hemos observado que la proteína NS5A, si bien no es capaz de inducir por sí sola, coopera con citocinas proinflamatorias en la inducción transcripcional de la ONSi. Sin embargo, la proteína del core del VHC no es capaz de alterar la expresión de la ONSi en este tipo de sistemas. Estos datos sugieren que otras proteínas víricas podrían estar afectando a la expresión de la ONSi en las HCV.

La generación de ON en la infección vírica no es un hecho aislado ya que una gran variedad de infecciones, incluyendo las bacterianas o parasitarias, inducen su producción como parte de la respuesta innata no específica frente a la invasión de microorganismos (Nathan, 1995). Recientemente, en ratones transgénicos para el VHB se ha demostrado que tanto el IFN- $\gamma$  como los IFN  $\alpha/\beta$  son capaces de inhibir la replicación de este virus (Guidotti y cols., 1996; Guidotti y Chisari, 1999). Posteriormente estos autores demostraron, mediante el cruce de estos ratones con ratones deficientes para el gen de ONSi, que la actividad antivírica asociada al IFN- $\gamma$ , pero no la asociada a los IFN  $\alpha/\beta$ , estaba relacionada con la capacidad para producir ON. Además sugerían que la capacidad para producir ON podría tener un efecto protector, ya que la inhibición de la replicación vírica reduciría la expresión de antígenos víricos en los hepatocitos y estos no serían reconocidos y posteriormente destruidos por las células del sistema inmune (Guidotti y cols., 2000). Esta capacidad de controlar la expresión vírica podría explicar en parte el hecho de que el tratamiento con glucocorticoides, un inhibidor de la expresión de la ONSi (Radowski y cols., 1990, Geller y cols., 1993), esté asociado a un incremento de la viremia en pacientes con HC (Scullard y cols., 1981). Sin embargo, la disminución de la replicación vírica podría ser uno de los mecanismos utilizados por el virus para evitar la respuesta inmune. Además, también se ha demostrado que la deficiencia en la ONSi puede reducir algunas de las manifestaciones patológicas asociadas a otras infecciones víricas. Estos datos sugieren que el efecto global, deletéreo o protector, asociado a la producción de ON es dependiente del tipo de infección vírica e incluso del estadio clínico estudiado (Nathan, 1997; Reiss y Komatsu, 1998).

La carencia de modelos animales y celulares de infección por el VHC no ha permitido determinar el papel que el ON ejercería sobre la replicación de este virus; sin embargo, el

amplio espectro de acción del ON sugiere que no sería descabellado pensar que podría afectar a su replicación (Reiss y Komatsu 1998).

La HCV provoca importantes alteraciones en la fisiopatología hepática, incluyendo diferencias en la expresión de distintas moléculas en comparación con el hígado sano. El ON tiene capacidad para modificar la expresión de un gran número de genes que codifican para proteínas de matriz extracelular, factores de crecimiento, citocinas, quimioquinas, receptores, hormonas y enzimas, bien a través de la alteración de rutas de transducción de señales o modificando directamente distintos factores de transcripción (Beck y cols., 1999). Concretamente, se ha descrito que el ON puede modificar la actividad de NF- $\kappa$ B, factor de transcripción regulado por el estado redox intracelular, debido a su capacidad para actuar tanto como molécula prooxidante como antioxidante. El ON puede incrementar la unión a ADN de NF- $\kappa$ B (Lander y cols., 1993) o reducirla, bien a través de la modificación de residuos de cisteína necesarios para dicha unión (Matthews y cols., 1996) o induciendo la síntesis y la translocación al núcleo de la proteína inhibidora I $\kappa$ B $\alpha$  (Spiecker y cols., 1997). Todos estos datos sugieren que el ON puede jugar un papel importante en los cambios en la expresión génica observados durante las HCV, incluso a través de la regulación de la expresión y la actividad de las enzimas que lo generan.

## **2. Incremento de la expresión de NT en las HCV. Relación con la intensidad histológica.**

Numerosos trabajos han implicado al ON en el control de procesos fisiológicos esenciales, además de en la patogenia de gran variedad de enfermedades. Sin embargo, el ON no es ni especialmente reactivo ni particularmente tóxico, por lo que se ha sugerido que diferentes moléculas derivadas del ON son las responsables del daño tisular (Grisham y cols., 1999).

Una de las vías que incrementan la toxicidad asociada a la producción de ON es su interacción con el anión superóxido para generar peroxinitrito, molécula que interacciona con proteínas celulares y provoca la formación de NT (Beckman, 1996; Groves, 1999). En el presente estudio hemos visto que la acumulación intrahepática de NT es significativamente más alta en pacientes con HCV en comparación con los que padecen hepatopatías no víricas (García-Monzón y cols., 2000). Debido a que la formación de peroxinitrito puede producirse "in vivo" (Beckman y cols., 1990), es concebible que en el tejido hepático de pacientes con HC se generen simultáneamente ON y O $_2^-$ , produciéndose peroxinitrito. Sin embargo, también



se ha demostrado que puede formarse NT en células polimorfonucleares activadas, a través de una reacción catalizada por la mieloperoxidasa, sin formación de peroxinitrito (Eiserich y cols., 1998); por lo tanto no podemos afirmar con rotundidad que la formación de NT en el tejido de los pacientes estudiados se deba única y exclusivamente a la generación de peroxinitrito.

Algunos tipos celulares hepáticos podrían ser considerados como potenciales candidatos para mediar la generación de peroxinitrito. Las células macrofágicas activadas, así como otros tipos celulares que constituyen el infiltrado inflamatorio o las células endoteliales, son capaces de generar y liberar radicales libres de oxígeno durante el proceso de inflamación tisular (Weiss, 1989; Grisham, 1994; Szabo y cols., 1995). Además, los hepatocitos podrían ser una fuente adicional de anión superóxido, ya que estas células pueden generarlo tras la incubación con moléculas donadoras de ON (D'Ambrossio y cols., 1997). Los focos de acumulación de NT en el tejido hepático se observan en grupos celulares que incluyen hepatocitos y células de Kupffer (macrófagos residentes CD11c+), lo que sugiere que dichas modificaciones podrían deberse a la reacción del anión superóxido liberado por células inflamatorias activadas (p ej.: células de Kupffer) localizadas junto a células productoras de ON (p ej: hepatocitos). Además, el hecho de que los focos de acumulación de NT se encuentren localizados principalmente en la proximidad de hepatocitos que expresan la proteína core del VHB, antígeno asociado a la replicación activa de este virus (Naoumov y cols., 1990), apoyaría la hipótesis de que el VHB participaría directamente en la producción de ON en los hepatocitos infectados "in vivo".

Finalmente, es de destacar la discrepancia entre los patrones de expresión hepatocelular de ONSi (citoplásmico y difuso) y la acumulación de NT (submembranoso y de distribución focal) en paciente con HCV. Esto podría ser debido a que la formación de NT es un proceso a largo plazo y que requiere la producción simultánea y continuada de ON y anión superóxido por parte de la misma célula o por células próximas, mientras que la expresión de ONSi puede tener lugar en la mayoría de hepatocitos, por la acción de proteínas víricas o de citocinas proinflamatorias sintetizadas en el hígado durante la HCV.

A pesar de que previamente había sido descrita la acumulación de NT en pacientes con HC (Cuzzocrea y cols., 1998), en este trabajo hemos demostrado que el incremento está estrechamente asociado con la intensidad del daño hepático en pacientes con HCV, mientras que en pacientes con hepatopatías no víricas (hepatopatía alcohólica o colestasis) y en biopsias de hígados histológicamente normales la acumulación de NT es mínima o no se

detecta (García-Monzón y cols., 2000). La presencia de NT ha sido detectada en patologías de muy distinta etiología como la arterioesclerosis, la enfermedad de Alzheimer, la artritis reumatoide, la colitis ulcerosa y el shock séptico donde pueden llegar a ser muy abundantes (Fukuyama y cols., 1997; Ischiropoulos, 1998). Aunque los efectos de la nitración de proteínas no es del todo conocida muy frecuentemente esta modificación está asociada a una pérdida o reducción de la funcionalidad de las mismas. Estos datos sugieren que la acumulación de NT podría tener un papel patogénico en procesos inflamatorios crónicos. En esta línea de argumentación, estudios en enfermedades pulmonares indican que la presencia de NT en el tejido inflamado son un signo de daño celular y no únicamente un epifenómeno o un marcador de la actividad inflamatoria (Haddad y cols., 1993 y 1994).

Parece existir un amplio consenso respecto a que cuando el ON es producido en pequeñas cantidades por las enzimas expresadas constitutivamente ejercería un papel protector, mientras que la generación de altos niveles de ON, asociados a la inducción de la ONSi, ejercería efectos deletéreos como la promoción de fenómenos inflamatorios y desarrollo de hepatocarcinoma (Wink y cols., 1998; Alarcon y cols., 1998; Zamora, 2000). Como sucede con una gran mayoría de los procesos fisiopatológicos influenciados por el ON, el papel de esta molécula en la carcinogénesis es controvertido. La generación de niveles elevados de ON puede provocar alteraciones tanto a nivel de proteínas como en el ADN y promover el crecimiento de tumores (Jenkins y cols., 1995) y, sin embargo, también es capaz de destruir células transformadas (Hibbs y cols., 1989). Diferentes líneas experimentales han puesto de manifiesto que un incremento en el daño oxidativo y nitrosativo del ADN, así como la inhibición de la maquinaria de reparación del ADN por radicales libres, podría facilitar el proceso de integración del genoma vírico con la consiguiente promoción de la hepatocarcinogénesis (Feitelson y cols., 1992; Petersen y cols., 1997), por lo que se cree que el trastorno en el balance redox de los hepatocitos puede jugar un papel importante en la progresión histológica de la HCV (Swietek y Luszyk, 1996; Larrea y cols. 1998). La sugerencia de que la N-acetilcisteína, un potente antioxidante capaz de inhibir la expresión de ONSi, puede incrementar la respuesta al interferón- $\alpha$  en pacientes con HCV, a través de un incremento de los sistemas antioxidantes intracelulares, refuerza el argumento de que el daño oxidativo hepatocelular participa en la patogenia de la HCV (Beloqui y cols., 1993; Mutlu-Turkoglu y cols. 1997).

Otro nexo de unión entre el ON y el cáncer parece estar mediado a través de la proteína p53. La sobreproducción de ON induce la acumulación de p53 y esta proteína puede

inhibir a su vez la expresión de la ONSi a nivel transcripcional (Forrester y cols., 1996). Sin embargo, el ON puede alterar la funcionalidad de p53 afectando así a uno de los mecanismos que regulan su síntesis (Camels y cols., 1997). Adicionalmente, también se ha descrito que la HBx es capaz de inhibir la actividad de p53 (Truant y cols., 1995). Estos datos sugieren que la alteración de la actividad de p53 por el ON y/o por la HBx, bien directamente o a través de la generación de ON, podría ser uno de los mecanismos responsables del marcado incremento en la expresión tisular de ONSi observado en las HCV.

El ON actúa como segundo mensajero en el control del crecimiento de células endoteliales (Ziche y cols., 1993) y es capaz de promover angiogénesis (Ziche y cols., 1994) e inducir la expresión de VEGF en células de hepatocarcinoma (Ching y cols., 1997). Recientemente, nuestro grupo ha descrito la existencia de un proceso de angiogénesis activa en los espacios porta de pacientes con HCV, lo que permite considerar la hipótesis de que el incremento de la expresión de ONSi en estas patologías podría estar relacionado con el proceso angiogénico observado (García-Monzón y cols., 1995). En definitiva, todos estos datos sugieren que la asociación epidemiológica que existe entre la HCV, la cirrosis y el hepatocarcinoma (Saito, 1990; Schafer y Sorrell, 1999) podría explicarse, al menos en parte, por el incremento en la expresión de ONSi que se observa en las HCV.

### 3. Modulación de la expresión de ONSi por la AdoMet.

Uno de los hechos más interesantes que hemos encontrado en este estudio es que la AdoMet es capaz de reducir la expresión intrahepática de ONSi inducida por LPS en ratas. Numerosos trabajos han permitido atribuir tanto propiedades beneficiosas como perjudiciales asociadas a la producción de ON durante la sepsis bacteriana (Laubach y cols., 1995; MacMicking y cols., 1995; Wei y cols., 1995; Vincent y cols., 2000). En varios modelos de endotoxemia en animales se ha determinado que la inhibición no selectiva de las ONSi incrementa el daño hepático (Billiar y cols., 1990). El examen histológico de los tejidos determinó la existencia de un incremento en la trombosis de la microvasculatura hepática, confirmándose el papel hepatoprotector del ON a través del mantenimiento de la integridad vascular y previniendo la agregación plaquetaria y la adhesión de leucocitos a endotelio (Harbrecht y cols., 1992). Sin embargo, en modelos de shock séptico en ratas inhibidores selectivos de la ONSi disminuyen el daño hepático y la peroxidación lipídica evitando la reducción de GSH intracelular (Szabo y cols., 1994; Zhang y cols., 2000). Nuestros experimentos indican que la AdoMet, a las dosis

terapéuticas escogidas, inhibe sólo parcialmente tanto la expresión de ONSi en el hígado como el incremento de los niveles séricos de ON inducidos por LPS. No obstante, como confirman numerosos datos recogidos en la literatura, una inhibición parcial puede ser suficiente para modular algunas de los efectos deletéreos asociados a una producción excesiva de ON, por lo que la AdoMet puede ser considerado como un potencial agente terapéutico en el tratamiento de patologías como el shock séptico donde el ON juega un papel relevante (Muscará y cols., 1999)

Nuestros experimentos utilizando cultivos primarios de hepatocitos de rata muestran cómo la AdoMet es capaz de reducir, de manera dosis-dependiente, la expresión de la ONSi inducida tanto por citocinas proinflamatorias como por el método de extracción de los hepatocitos. Adicionalmente, la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, factor clave en el control de la expresión de la ONSi, también puede ser inhibida parcialmente por la AdoMet. La degradación de las proteínas inhibidoras I $\kappa$ B, que se encuentran formando complejos en el citoplasma con los distintos miembros de NF- $\kappa$ B, juega un papel determinante en el control de la actividad de este factor de transcripción (Baldwin, 1996). Los hepatocitos de rata contienen una cantidad apreciable de estos inhibidores y tras la estimulación por citocinas proinflamatorias son total o parcialmente degradados para resintetizarse posteriormente, impidiendo así la activación prolongada de NF- $\kappa$ B. En el caso de I $\kappa$ B  $\alpha$ , la AdoMet es capaz de inducir su síntesis en hepatocitos de rata no estimulados, y promover una síntesis más rápida tras la estimulación con citocinas. Además, la AdoMet fue capaz de prevenir la degradación de I $\kappa$ B  $\beta$ .

La AdoMet también es eficaz para reducir la inducción de ONSi, tanto a nivel de ARNm como de proteína, mediada por citocinas proinflamatorias en líneas celulares derivadas de hepatocitos humanos. Además, los experimentos de transfección transitoria pusieron de manifiesto que dicha inhibición podría estar mediada, en lo que respecta a este tipo celular y al menos parcialmente, a través del control transcripcional del gen de la ONSi.

La AdoMet puede atenuar el daño hepático producido por una gran variedad de compuestos hepatotóxicos como el paracetamol, el tetracloruro de carbono, el etanol, el bromobenceno y la D-galactosamina (Mato y cols., 1997), y además protege a los hepatocitos de los efectos tóxicos derivados de la exposición a distintas citocinas proinflamatorias (Arias-Díaz y cols., 1996). Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales la AdoMet ejerce estos efectos protectores no se conocen con exactitud (Mato y cols., 1997). En el caso

particular de la modulación de la expresión de la ONSi diferentes mecanismos pueden ser considerados como candidatos para explicar este efecto. En primer lugar, la AdoMet es el principal donador de grupos metilo en las reacciones de metilación implicadas en la regulación de procesos fisiológicos esenciales como el control de la fluidez de membranas, la transmisión de señales, la actividad de factores de transcripción y la expresión génica (Chiang y cols., 1996; García-Trevijano y cols., 2000). Estudios preliminares llevados a cabo por nuestro grupo, utilizando inhibidores no selectivos de este tipo de reacciones, muestran cómo estos compuestos bloquean totalmente la inducción de la ONSi por citocinas proinflamatorias, por lo que no es posible conocer, con este abordaje experimental, si alguna reacción de metilación específica está implicada en la inhibición de la expresión de ONSi mediada por la AdoMet.

Otra importante propiedad de la AdoMet es la de servir como sustrato para la generación de cisteína necesaria para la síntesis de GSH, el principal de los sistemas antioxidantes celulares, a través de la ruta de transulfuración (DeLeve y Kaplowitz 1991; Mato y cols., 1997). Estudios en humanos han demostrado que la administración de la AdoMet era capaz de incrementar los niveles de GSH en individuos con hepatopatía alcohólica y no alcohólica (Vendemiale y cols., 1989). Además, incrementa el contenido de GSH mitocondrial en cultivos primarios de hepatocitos de ratas crónicamente tratadas con etanol al tiempo que prevenía el incremento en la susceptibilidad a TNF- $\alpha$  observado en estas células (Collet y cols., 1998). La expresión de la ONSi está regulada por los niveles de GSH (Harbrecht y cols., 1997) y a su vez el ON es capaz de regular la síntesis de este compuesto (Kuo y Abe, 1996). Otras líneas de investigación han determinado que los radicales libres de oxígeno están implicados en el control de la expresión del gen de la ONSi y que la ruta de transducción de señales implicada es sensible a antioxidantes (Duval y cols., 1996; Kuo y cols., 1997). Estos datos sugieren que la AdoMet podría modular la expresión de la ONSi a través de su capacidad para controlar los niveles intracelulares de GSH. Sin embargo, nuestros datos preliminares indican que la AdoMet no incrementa significativamente la cantidad total de GSH en hepatocitos de rata, aunque quizás sí pueda modificar selectivamente el contenido en algún compartimento celular concreto, por lo que no es posible descartar que la AdoMet module la expresión de la ONSi a través de su metabolización a GSH. Además, se ha descrito que la Adomet pueda actuar como molécula antioxidante, sin necesidad de ser previamente metabolizada (Evans y cols., 1997), por lo que podría modular la expresión de ONSi a través de un efecto antioxidante directo. Datos preliminares de nuestro grupo muestran que otras

moléculas con capacidad antioxidante, como la N-acetilcisteína y los ditiocarbamatos, también son capaces de inhibir la inducción de la ONSi mediada por citocinas proinflamatorias en células derivadas de hepatocitos humanos.

Por otro lado, el ON generado en modelos de shock séptico o de hipoxia en ratas (Avila y cols., 1997 y 1998) puede inhibir la actividad de la enzima que sintetiza la AdoMet, la MAT sintetasa por nitrosilación de un residuo de cisteína localizado en la posición 121 (Ruiz y cols., 1998; Corrales y cols., 1999); por tanto la AdoMet, a través de la inhibición de la ONSi, podría incrementar indirectamente sus propios niveles.

Como ya comentamos anteriormente, existe un incremento en la expresión hepato-celular de la ONSi y una marcada acumulación de NT en la HCV (García-Monzón y cols., 2000). Resultados preliminares de nuestro grupo han puesto de manifiesto que la AdoMet modula la generación de NT mediada por citocinas proinflamatorias en cultivos primarios de hepatocitos de rata., dato que sugiere que ésta podría ser utilizada para prevenir la generación de NT.

Finalmente, un hecho bien conocido es que la activación de NF- $\kappa$ B está directamente implicada en la activación de citocinas, moléculas de adhesión y distintas enzimas implicadas en el proceso inflamatorio, por lo que el control de la actividad de este factor de transcripción sería una potencial vía terapéutica en el tratamiento de enfermedades como la pancreatitis aguda, la glomerulonefritis, la artritis reumatoide y el shock séptico (Sukurai y cols., 1996; Lui y cols., 1997; Steinle y cols., 1999; Schmidt, 2000). Nuestro trabajo muestra cómo la Adomet modula la actividad de NF- $\kappa$ B "in vitro". Actualmente carecemos de datos que confirmen que este mecanismo sea operativo "in vivo", hipótesis que está siendo investigada en nuestro laboratorio y que permitiría valorar la utilidad de la AdoMet en el tratamiento de un buen número de procesos inflamatorios que, como las HCV, suponen un importante problema en materia de salud pública a nivel mundial.

**CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1. En el hígado de pacientes con HCV existe una elevada expresión de la enzima ONSi independiente del grado de actividad inflamatoria, dato que sugiere que la infección vírica podría jugar un papel activo en el incremento de la expresión de la ONSi en estas patologías.
2. En pacientes con HCV existe un incremento en la acumulación intrahepática de NT relacionada con el grado de lesión hepática.
3. La proteína HBx del VHB inducen la expresión del gen de la enzima ONSi en líneas derivadas de hepatocitos humanos. Este efecto está mediado, al menos parcialmente, a través de la activación de la unión de NF- $\kappa$ B a una secuencia localizada en posición -112 del promotor de la ONSi humana.
4. La AdoMet inhibe la expresión intrahepática de la enzima ONSi y el incremento de los niveles séricos de ON en un modelo de endotoxemia en ratas.
5. La AdoMet inhibe la expresión de la enzima ONSi en hepatocitos de rata y en líneas derivadas de hepatocitos humanos. Este efecto está mediado, al menos parcialmente, a través del control de la actividad de NF- $\kappa$ B.



**BIBLIOGRAFIA**

**BIBLIOGRAFIA.**

1. Akaike T, Weihe E, Schaefer M, Fu ZF, Zheng YM, Vogel W, Schmidt H, Koprowski H, Dietzschold B. Effect of neurotropic virus infection on neuronal and inducible nitric oxide synthase activity in rat brain. *J Neurovirol* 1995; 1: 118-125.
2. Alarcon LH, Taylor BS, Billiar TR. The role of nitric oxide in liver pathophysiology. En: Boyer JL, Ockner RK, eds. *Progress in liver disease*. Vol 15. Philadelphia:Saunders 1997: 85-108.
3. Aletta JM, Cimato TR, Ettinger JM. Protein methylation: a signal event in post-translational modifications. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 89-91.
4. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, Miller JK, Gerber MA, Sampliner RE. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med* 1992; 327: 1899-905.
5. Amaro MJ, Bartolomé J, Carreño V. Hepatitis B virus X protein transactivates the inducible nitric oxide synthase promoter. *Hepatology* 1999; 29: 915-923.
6. Ambs S, Ogunfusika MO, Merriam WG, Bennett WP, Billiar TR, Harris CC. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase expression in cancer-prone p53 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8823-8828.
7. Amin AR, Di Cesare PE, Vyas P, Attur M, Tzeng E, Billiar TR, Stuehr SA, Abramson SB. The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: Evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1995; 182: 2097-2102.
8. Arias-Díaz J, Vara E, García C, Villa N, Rodríguez JM, Ortiz P, Balibrea JL. S-adenosyl-methionine protects hepatocytes against the effects of cytokines. *J Surg Res* 1996; 62: 79-84.
9. Avila MA, Mingorance J, Martínez-Chantar ML, Casado M, Martín-Sanz P, Boscá L, Mato JM. Regulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase during septic shock: role of nitric oxide. *Hepatology* 1997; 25: 391-396.
10. Avila MA, Carretero MV, Rodríguez EN, Mato JM. Regulation by hypoxia of methionine adenosyltransferase activity and gene expression in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1998; 114: 364-371.
11. Baeuerle PA, Henkle T. Function and activation of NF- $\kappa$ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 141-179.
12. Balakirev MY, Khrantsov VV, Zimmer G. Modulation of the mitochondrial permeability transition by nitric oxide. *Eur J Biochem* 1997; 246: 710-718.
13. Baldwin AS Jr. The NF- $\kappa$ B and I  $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-683.
14. Beck KF, Eberhardt W, Frank S, Huwiler A, Mebner UK, Mühl H, Pfeilschifter. Inducible NO synthase: Role in cellular signalling. *J Exp Biol* 1999; 202: 645-653.
15. Beckman JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 1996; 9: 836-844.

16. Beckman JS, Koppenol WK. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: C1424-C1437.
17. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620-1624.
18. Beg AA, Baldwin AS Jr. The I Kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes Dev* 1993; 7 :2064-2070.
19. Beloqui O, Prieto J, Suárez M, Gil B, Qian CH, Garcia N, Civeira MP. N-Acetylcysteine enhances the response to interferon-alpha in chronic hepatitis C: a pilot study. *J Interferon Res* 1993; 13: 279-282.
20. Benedict YTS. Hepadnaviral X protein: Review of recent progress. *J Biomed Sci* 1996; 3: 20-30.
21. Bann J, Schneider RJ. Hepatitis virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signalling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10350-10354.
22. Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, Plaisance S, Lee JC, Haegeman G, Cohen P, Fiers W. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J* 1996; 15: 1914-1923.
23. Billiar TR, Curran RD, Harbrecht BG, Stuehr DJ, Demetris AJ, Simmons RL. Modulation of nitric oxide synthase in vivo: NG-monomethyl-L-arginine inhibits endotoxin-induced nitrite/nitrate biosynthesis while promoting hepatic damage. *J Leukoc Biol* 1990; 48: 565-569.
24. Billiar TR, Curran RD, Stuehr DJ, West MA, Bentz BG, Simmons RL. An L-arginine-dependent mechanism mediates Kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis in vitro. *J Exp Med.* 1989; 169: 1467-1472.
25. Boyer JL. Chronic hepatitis-A perspective on classification and determinants of prognosis. *Gastroenterology* 1976; 70: 1161.
26. Brass EP, Vetler WH. Inhibition of glucagon-stimulated glycogenolysis by S-nitroso-N-acetylpenicillamine. *Pharmacol Toxicol* 1993; 72: 369-372.
27. Brechot C. Hepatitis C virus genetic variability: clinical implications. *Am J Gastroenterol.* 1994; 89: S41-S47.
28. Butler AR, Flitney FW, Williams DLH. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16: 18-22.
29. Cabafias C, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, Bellon T, Fernandez JM, Larraga V, Bernabeu C. Characterization of a CD11c-reactive monoclonal antibody (HC1/1) obtained by immunizing with phorbol ester differentiated U937 cells. *Hybridoma.* 1988; 7: 167-76.
30. Calmels S, Hainaut P, Ohshima H. Nitric oxide induces conformational and functional modifications of wild-type p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res.* 1997; 5: 3365-3369.
31. Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shimer S, Cerami A. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules

- specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci USA*; 83: 1670-1674.
32. Castaño JG, Alemany S, Nieto A, Mato JM. Activation of phospholipid methyltransferase by glucagon in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1980; 255: 9041-9043.
  33. Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D, Maniatis T. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 1995; 9: 1586-1597.
  34. Cheong J, Yi M, Lin Y, Murakami S. Human RPB5, a subunit shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases, binds human hepatitis B virus X protein and may play a role in X transactivation. *EMBO J* 1995; 14: 143-150.
  35. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP. S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J* 1996; 10: 471-480.
  36. Chin K, Kurashima Y, Ogura T, Tajiri H, Yoshida S, Esumi H. Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* 1997; 15: 437-442.
  37. Chirillo P, Falco M, Puri PL, Artini M, Balsano C, Levrero M, Natoli G. Hepatitis B virus pX activates NF-kB dependent transcription through a Raf-independent pathway. *J Virol* 1996; 70: 641-646.
  38. Chirillo P, Pagano S, Natoli G, Puri PL, Burgio VL, Balsano C, Levrero M. The hepatitis B virus pX gene induces p53-mediated programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8162-8167.
  39. Chisari F, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 29-60.
  40. Chisari FV. Viruses, immunity, and cancer: lessons from hepatitis B. *Am J Pathol* 2000; 156: 1118-1132.
  41. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
  42. Clemens MG, Bauer M, Pannen BH, Bauer I, Zhang JX. Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion. *Shock* 1997; 8: 80-85.
  43. Clemens MG. Does altered regulation of eNOS in sinusoidal endothelial cells determine increased intrahepatic resistance leading to portal hypertension? *Hepatology* 1998; 27: 1745-1747.
  44. Clemens MG. Nitric oxide in liver injury. *Hepatology* 1999; 30: 1-5.
  45. Collé A, García-Ruiz C, Miranda M, Ardite E, Mari M, Morales A, Corrales F, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes hepatocytes to tumor necrosis factor. *Gastroenterology* 1998; 115: 1541-1551.
  46. Corrales FJ, Ruiz F, Mato JM. In vivo regulation by glutathione of methionine adenosyltransferase S-nitrosylation in rat liver. *J Hepatol* 1999; 31: 887-894.
  47. Costantini P, Petronilli V, Colonna R, Bernardi P. On the effects of paraquat on isolated mitochondria. Evidence that paraquat causes opening of the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore synergistically with nitric oxide. *Toxicology* 1995; 99: 77-88.

48. Cromlish RJ. Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma: possible roles for HBx. *Trends in Microbiology* 1996; 4: 270-274.
49. Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, Hofmann K, Simmons RL. Hepatocytes produce nitrogen oxide from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J Exp Med* 1989; 170: 1769-1774.
50. Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, Ochoa JB, Harbrecht BG, Flint SG, Simmons RL. Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis. *Ann Surg* 1990; 212: 462-471.
51. Curran RD, Ferrari FK, Kispert PH, Stadler J, Stuehr DJ, Simmons RL, Billiar TR. Nitric oxide and nitric oxide-generating compounds inhibit hepatocyte protein synthesis. *FASEB J* 1991; 5: 2085-2092.
52. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Villari D, Caputi AP, Longo G. Evidence for in vivo peroxynitrite production in human chronic hepatitis. *Life Sci* 1998; 63: 25-30.
53. Czaja AJ. Chronic active hepatitis. The challenge for a new nomenclature. *Ann Intern Med* 1993; 119: 510-517.
54. D'Ambrosio SM, Oberyszyn TM, Brady T, Ross MS, Robertson FM. Sensitivity of human hepatocytes in culture to reactive nitrogen intermediates. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 233: 545-549.
55. De Francesco. Molecular virology of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 1999; 31 (Supl 1): 47-53.
56. De Vera ME, Shapiro RA, Nussler AK, Mudgett JS, Simmons RL, Morris SM, Billiar TR, Geller DA. Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1054-1059.
57. De Leve LD, Kaplowitz N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 1991; 52 :287-305.
58. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994; 19: 1513-1520.
59. Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowma A, Snyder SH. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4214-4218.
60. Doria M, Klein N, Lucito R, Schneider RJ. The hepatitis B virus HBx protein is a dual specificity cytoplasmic activator of Ras and nuclear activator of transcription factors. *EMBO J* 1995 ; 14: 4747-4757.
61. Duval DL, Miller DR, Collier J, Billings RE. Characterization of hepatic nitric oxide synthase: Identification as the cytokine-inducible form primarily regulated by oxidants. *Mol Pharmacol* 1996; 50: 277-284.
62. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 1998; 391: 393-397.
63. Esteban FJ, Pedrosa JA, Jiménez A, Fernández AP, Bentura ML, Martínez-Murillo R, Rodrigo J, Peinado MA. Distribution of neuronal nitric oxide synthase in the rat liver. *Neurosci Lett* 1997; 226: 99-102.

64. Evans PJ, Whiteman M, Tredger JM, Halliwell B. Antioxidant properties of S-adenosyl-L-methionine: A proposed addition to organ storage fluids. *Free Radic Biol Med* 1997; 23: 1002-1008.
65. Fang FC. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest* 1997; 99: 2818-2825.
66. Feitelson M. Hepatitis B virus infection and primary hepatocellular carcinoma. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5: 275-301.
67. Feitelson MA, Duan LX. Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 1997; 150: 1141-1157.
68. Ferrari C, Urbani S, Penna A, Cavalli A, Valli A, Lamonaca V, Bertoni R, Boni C, Barbieri K, Uggeri J, Fiaccadori F. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 1999; 31: 31-38.
69. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990; 1: 228-236.
70. Forrester K, Ambs S, Lupold SE, Kapust RB, Spillare EA, Weinberg WC, Felley-Bosco E, Wang XW, Geller DA, Tzeng E, Billiar TR, Harris CC. Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2442-2447.
71. Frederick JA, Hasselgren PO, Davis S, Higashiguchi T, Jacob TD, Fischer JE. Nitric oxide may upregulate in vivo hepatic protein synthesis during endotoxemia. *Arch Surg* 1993; 128: 152-156.
72. Frezza M, Surrenti C, Manzillo G, Fiaccadori F, Bortolini M, Di Padova C. Oral S-adenosylmethionine in the symptomatic treatment of intrahepatic cholestasis. A double-blind, placebo-controlled study. *Gastroenterology* 1990; 99: 211-215.
73. Frezza M, Tritapepe R, Pozzato G, Di Padova C. Prevention of S-adenosylmethionine of estrogen-induced hepatobiliary toxicity in susceptible women. *Am J Gastroenterol*. 1988;83:1098-1102.
74. Fukuyama N, Takebayashi Y, Hida M, Ishida H, Ichimori K, Nakazawa H. Clinical evidence of peroxynitrite formation in chronic renal failure patients with septic shock. *Free Radic Biol Med* 1997;22:771-774.
75. García-Monzón C, Moreno-Otero R, Pajares JM, García-Sánchez A, López-Botet M, Ortiz de Landáuzuri M, Sánchez-Madrid F. Expression of a novel activation antigen on intrahepatic CD8+ T lymphocytes in viral chronic active hepatitis. *Gastroenterology* 1990; 98: 1029-1035.
76. García-Monzón C, Sánchez-Madrid F, García-Buey L, García-Arroyo A, García-Sánchez A, Moreno-Otero R. Vascular adhesion molecule expression in viral chronic hepatitis: evidence of neoangiogenesis in portal tracts. *Gastroenterology* 1995; 108: 231-241.
77. García-Monzón C, Majano PL, Zubia-Lauzurica I, Sanz P, Apolinario A, Moreno Otero R. Intrahepatic accumulation of nitrotyrosine in chronic viral hepatitis evidence for nitric oxide-related liver damage. *Hepatology* 2000; 32: 331-338.
78. García-Trevijano E, Latasa MU, Carretero MV, Berasáin C, Mato JM, Avila MA. S-adenosylmethionine regulates MAT1A and MAT2A gene expression in cultured rat

hepatocytes: a new role for S-adenosylmethionine in the maintenance of the differentiated status of the liver. *FASEB J* 2000; 14: 2511-2518.

79. Geall MG, Schoenfield LJ, Summerskill WHJ. Classification and treatment of chronic active liver diseases. *Gastroenterology* 1968; 55: 724.
80. Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, Simmons RL, Billiar TR. Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993a; 90: 522-526.
81. Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Nussler AK, Di Silvio M, Wang SC, Nakayama DK, Simmons RL, Snyder SH, Billiar TR. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993b; 90: 3491-3495.
82. Geller DA, Freeswick PD, Nguyen D, Nussler AK, Di Silvio M, Shapiro RA, Wang SC, Simmons RL, Billiar TR. Differential induction of nitric oxide synthase in hepatocytes during endotoxemia and the acute-phase response. *Arch Surg* 1994; 129: 165-171.
83. Geller DA, de Vera ME, Russell DA, Shapiro RA, Nussler AK, Simmons RL, Billiar TR. A central role for IL-1 $\beta$  in the in vitro and in vivo regulation of hepatic inducible nitric oxide synthase:IL-1 $\beta$  induces hepatic nitric oxide synthesis. *J Immunol* 1995; 155: 4890-4898.
84. Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev* 1998; 17: 7-23.
85. Ghezzi P, Saccardo B, Villa P, Rossi V, Bianchi M, Dinarello CA. Role of interleukin-1 in the depression of liver drug metabolism by endotoxin. *Infect Immun.* 1985; 54: 837-40.
86. Giulivi C. Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. *Biochem J* 1998; 332: 673-679.
87. González-Amaro R, García-Monzón C, García-Buey L, Moreno-Otero R, Alonso JL, Yagüe E, Pivel JP, López-Cabrera M, Fernández-Ruiz E, Sánchez-Madrid F. Induction of tumor necrosis factor  $\alpha$  production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis. *J Exp Med* 1994; 179:841-848.
88. Gosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins:evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;15:225-260.
89. Green LC, Wagner DA, Glogowsky J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and (ISN) nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126: 131-138.
90. Griffith OW, Sthuer D. Nitric oxide synthases: Properties and catalytic mechanism. *Ann Rev Physiol* 1995; 57: 707-736.
91. Grilli M, Chiu JJ, Leonardo MJ. NF-kappa B and Rel:participants in multifactorial transcriptional regulatory system. *Nt Rev Cytol* 1993; 143: 1-62.
92. Griscavage JM, Wilk S, Ignarro LJ. Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 3308-3312.
93. Grisham M. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1994;

344: 859-861.

94. Griesham MB, Jourdain D, Wink DA. Nitric Oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 1999; 276: G315-321.
95. Groves JT. Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic. *Curr Opin Chem Biol* 1999; 3: 226-235.
96. Grzybicki DA, Kwack KB, Perlman S, Murphy SP. Nitric oxide synthase type II expression by different cell types in MHV-JHM encephalitis suggests distinct roles for nitric oxide in acute versus persistent infection. *J Neuroimmunol* 1997; 73: 15-27.
97. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996; 4: 25-36.
98. Guidotti LG, Chisari FV. Cytokine-induced viral purging-role in viral pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*. 1999; 2: 388-391.
99. Guidotti LG, McClary H, Loudis JM, Chisari FV. Nitric oxide inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J Exp Med* 2000; 191: 1241-1252.
100. Haddad YI, Ischiropoulos H, Holm BA, Beckman JS, Baker JR, Matalon S. Mechanism of peroxynitrite-induced injury to pulmonary surfactants. *Am J Physiol* 1993; 265: L555-564.
101. Haddad YI, Pataki G, Hu P, Galliani C, Beckman JS, Matalon S. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest* 1994; 94: 2407-13.
102. Harbrecht BG, Billiar TR, Stadler J, Demetris AJ, Ochoa J, Curran RD, Simmons RL. Inhibition of nitric oxide synthesis during endotoxemia promotes intrahepatic thrombosis and an oxygen radical-mediated hepatic injury. *J Leukoc Biol* 1992; 52: 390-394.
103. Harbrecht BG, DiSilvio M, Chough V, Kim YM, Simmons RL, Billiar TR. Glutathione regulates nitric oxide synthase in cultures hepatocytes. *Ann Surg* 1997; 225: 76-87.
104. Harris N, Buller RML, Karupiah G. Gamma interferon-induced nitric oxide-mediated inhibition of vaccinia virus replication. *J Virol* 1995; 69: 910-915.
105. Hata K, van Thiel DH, Herberman RB, Whiteside TH. Phenotypic and functional characteristics of lymphocytes isolated from liver biopsy specimens from patients with active liver disease. *Hepatology* 1992; 15: 816-823.
106. Heck S, Bender K, Kullmann M, Gottlicher M, Herrlich P, Cato AC. I Kappa B alpha-independent downregulation of NF-kappa B activity by glucocorticoid receptor. *EMBO J* 1997; 16: 4698-4707.
107. Hehner SP, Heinrich M, Bork PM, Vogt M, Ratter F, Lehmann, Schulze-Osthoff, Dröge W, Schmitz ML. Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF-kB by preventing the degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$  and I $\kappa$ B- $\beta$ . *J Biol Chem* 1998; 273: 1288-1297.
108. Helyar L, Bundschuh DS, Laskin JD, Laskin DL. Induction of hepatic Ito cell nitric oxide production after acute endotoxemia. *Hepatology* 1994; 20: 1509-1515.
109. Hibbs JB, Zabrin Z, Taintor RR. L-arginine is required for the expression of the activated macrophage effector mechanisms causing selective metabolic inhibition in



- target cells. *J Immunol* 1987; 138: 550-565.
110. Hierholzer C, Harbrecht B, Menezes JM, Kane J, MacMicking J, Nathan CF, Peitzman A, Billiar TR, Tweardy DJ. Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. *J Exp Med* 1998; 187: 917-928.
111. Hildt E, Urban S, Lauer U, Hofschneider P, Kekulé A. ER-localization and functional expression of the HBV transactivator MHBs. *Oncogene* 1993; 8: 3359-3367.
112. Honda M, Kaneko S, Sakai A, Unoura M, Murakami S, Kobayashi. Degree of diversity of hepatitis C virus quasispecies and progression of liver disease. *Hepatology* 1994; 20: 1144-1151.
113. Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997; 26 (Supl.1): 15-20.
114. Hortelano S, Dallaporta B, Zanzani N, Hirsch T, Susin SA, Marzo I, Bosca L, Kroemer G. Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* 1997; 410: 373-377.
115. Hortelano S, Genaro A, Bosca L. Phorbol esters induce nitric oxide synthase activity in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1992; 267: 24937-24940.
116. Horton RA, Leppi DE, Knowles RG, Titheradge MA. Inhibition of hepatic gluconeogenesis by nitric oxide: A comparison with endotoxic shock. *Biochem J* 1994; 299: 735-739.
117. Houghton M. Hepatitis viruses. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*, 3rd ed. New York: Raven Press; 1996: 1035-1058.
118. Hu Z, Zhang Z, Doo E, Coux E, Goldberg AL, Liang TJ. Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. *J Virol* 1999; 73: 7231-7240.
119. Huang J, Kwong J, Sun E, Liang TJ. Proteasome complex as a potential cellular target of hepatitis B virus X protein. *J Virol* 1996; 70: 5582-5591.
120. Ignarro LJ, Buga JM, Woods KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9265-9269.
121. Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990; 30: 535-560.
122. Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 1998; 356:1-11.
123. Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, Moss DW, Holmes LS, Baylis SA, Rhodes P, Westmore K, Emson PC, Moncada S. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 4392-4396.
124. Kanner J, Harel S, Granit R. Nitric oxide as an antioxidant. *Arch Biochem Biophys* 1991; 289: 130-136.
125. Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology*. 2000;32:405-412.

126. Kekulé A, Lauer U, Meyer M, Caschmann W, Hofschneider P, Koshy R. The pre S2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator. *Nature* 1990; 343: 457-460.
127. Kim YM, Talanian RV, Billiar TR. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 1997a; 272: 31138-31148.
128. Kim YM, de Vera ME, Watkins SC, Billiar TR. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J Biol Chem* 1997b; 272: 1402-1411.
129. Kim YM, Kim TH, Chung HT, Talanian RV, Yin XM, Billiar TR. Nitric oxide prevents tumor necrosis factor alpha-induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosylation of caspase 8. *Hepatology*. 2000; 32: 770-778.
130. Knodell RG, Ishack KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kierman TW, Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 5: 431-435.
131. Knowles RG, Salter M, Brooks SL, Moncada S. Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172: 1042-1048.
132. Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, Stamler JS. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 9: 371-377.
133. Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 1994; 372: 546-548.
134. Koike K. Hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis. *Intervirology* 1995; 38: 134-142.
135. Kuo PC, Abe KY, Schroeder RA. Oxidative stress increases hepatocyte iNOS gene transcription and promoter activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234: 289-292.
136. Kuo PC, Abe KY. Nitric oxide-associated regulation of hepatocyte glutathione synthesis is a guanylyl cyclase-independent event. *Surgery* 1996; 120: 309-314.
137. Kurose I, Kato S, Ishii H, Fukumura D, Miura S, Suematsu M, Tsuchiya M. Nitric oxide mediates lipopolysaccharide-induced alteration of mitochondrial function in cultured hepatocytes and isolated perfused liver. *Hepatology* 1993; 18: 380-388.
138. Lander HM, Sehajpal P, Levine DM, Novogrodsky A. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds. *J Immunol* 1993; 150: 1509-1516.
139. Lara-Pezzi E, Majano PL, Gómez-Gonzalo M, García-Monzón C, Moreno-Otero R, Levrero M, López-Cabrera M. Hepatitis B virus X protein up-regulates Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  gene expression in hepatocytes. *Hepatology* 1998a; 28: 1013-1021.
140. Lara-Pezzi E, Armesilla AL, Majano PL, Redondo JM, López-Cabrera. The hepatitis B virus X protein activates nuclear factor of activated T cells (NF-AT) by a cyclosporin A-sensitive pathway. *EMBO J* 1998b; 17: 7066-7077.

141. Lars-Pezzi E, Majano PL, Yáñez-Mo M, Gómez-Gonzalo M, Carretero M, Moreno-Otero R, Sánchez-Madrid F, López-Cabrera M. Effect of the hepatitis B virus protein on integrin-mediated adhesion to and migration on extracellular matrix. *J Hepatol* 2001 (En prensa).
142. Larrea E, Beloqui O, Muñoz-Navas MA, Civeira MP, Prieto J. Superoxide dismutase in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 1235-41.
143. Laubach VE, Shesely E, Smithies O, Sherman P. Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10688-11692.
144. Lauth WW, Greenway CV. Conceptual review of the hepatic vascular bed. *Hepatology* 1987 ;7: 952-963.
145. Li J, Billiar TR, Talanian RV, Kim YM. Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 240: 419-424.
146. Li J, Billiar TR. Nitric oxide IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in the liver. *Am J Physiol* 1999; 276: G1069-G1073.
147. Lieber CS, Casini A, De Carli LM, Kim C, Lowe N, Sasaki R, Leo MA. S-Adenosyl-L-methionine attenuates alcohol-induced liver injury in the baboon. *Hepatology* 1990; 11: 165-172.
148. Lieber CS. Role of S-adenosyl-L-methionine in the treatment of liver diseases. *J Hepatol*. 1999; 30: 1155-1159.
149. Liu RH, Baldwin B, Tennant BC, Hotchkiss JH. Elevated formation of nitrate and N-nitrosodimethylamine in woodchucks (*Marmota monax*) associated with chronic woodchuck hepatitis virus infection. *Cancer Res* 1991; 51: 3925-3929
150. Liu RH, Jacobs JR, Tennant BC, Hotchkiss JH. Nitrite and nitrosamine synthesis by hepato-cytes isolated from normal woodchucks (*Marmota monax*) and woodchucks chronically infected with woodchuck hepatitis virus. *Cancer Res* 1992; 52: 4139-4143.
151. Liu RH, Jacobs JR, Hotchkiss JH, Cote PJ, Gerin JL, Tennant BC. Woodchuck hepatitis virus surface antigen induces nitric oxide synthesis in hepatocytes: possible role in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1994; 15: 2875-2877.
152. Liu SF, Ye X, Malik AB. In vivo inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B activation prevents inducible nitric oxide synthase expression and systemic hypotension in a rat model of septic shock. *J Immunol* 1997; 159: 3976-3983.
153. Liu ZZ, Cui S, Billiar TR, Dorko K, Halfer W, Geller DA, Michalopoulos G, Beger HG, Albina J, Mussler AK. Effect of hepatocellular mitogens on cytokine-induced nitric oxide synthase in human hepatocytes. *J Leukoc Biol* 1996; 60: 382-388.
154. Loscalzo J. Nitric oxide and vascular disease. *N Engl J Med* 1995; 333: 251-253.
155. Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 15; 90: 9730-9734.
156. Lowenstein CJ, Hill SL, Lafond-Walker A, Wu J, Allen G, Landavere M, Rose NR, Herskowitz A. Nitric oxide inhibits viral replication in murine myocarditis. *J Clin*

- Invest 1996; 97: 1837-1843.
157. Lucito R, Schneider RJ. Hepatitis B virus X protein activates transcription factor NF- $\kappa$ B without a requirement for protein kinase C. *J Virol* 1992; 66: 983-991.
158. MacMicking J, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher D, Trumbauer M, Stevens K, Xie Q, Sorol K, Hutchinson N, Chen H, Mudgett J. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 1995; 81: 641-650.
159. Maguire HF, Hoeffler JP, Siddiqui A. HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science* 1991; 252: 842-844.
160. Mahé Y, Mukaida N, Kuno K, Akiyama M, Ikeda N, Matsushima K, Murakami S. Hepatitis B virus X protein transactivates human interleukin-8 gene through acting on Nuclear Factor  $\kappa$ B and CAAT/Enhancer-binding protein-like cis-element. *J Biol Chem* 1991; 266: 13759-13763.
161. Majano PL, García-Monzón C, López-Cabrera M, Lara-Pezzi E, Fernández-Ruiz E, García-Iglesias C, Borque MJ, Moreno-Otero R. Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis. Evidence for a virus-induced upregulation. *J Clin Invest* 1998; 101: 1343-1352.
162. Majano PL, Lara-Pezzi E, López-Cabrera M, Apolinario A, R. Moreno Otero, García-Monzón C. Hepatitis B virus X (HBx) induces inducible nitric oxide synthase (ONSi) gene promoter through the proximal NF- $\kappa$ B-binding site: cytoplasmic location of HBx is essential for iNOS promoter induction. *Hepatology* 2001a (sometido).
163. Majano P.L. García-Monzón C, Corrales FJ, Mato JM, García-Trevijano E, Cámara J, Ortiz P, Avila MA, Moreno Otero R. Modulation of hepatic inducible nitric oxide synthase expression by S-adenosylmethionine. *Hepatology* 2001b (sometido).
164. Major ME, Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 25: 1527-1538.
165. Marcellin P. Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease. 1999. *J Hepatol*: 31 (suppl 1): 9-16.
166. Marks-Konczalik J, Chu SC, Moss J. Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor-kappaB-binding sites. *J Biol Chem* 1998; 273: 22201-22208.
167. Marletta M. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993; 268: 12231-12334.
168. Marletta M. Nitric oxide synthase: Aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 1994; 78: 927-930.
169. Mato JM, Alvarez L, Cormales F, Pajares MA. S-adenosylmethionine in the liver. En: *The Liver: Pathology and pathobiology, 1994 Second Edition* (Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA 3rd eds. Raven Press, New York: 461-470
170. Mato JM, Alvarez L, Ortiz P, Pajares MA. S-adenosylmethionine synthesis: Molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacol Ther* 1997; 73: 265-280.
171. Mato JM, Cámara J, Fernández de Paz J, Caballería L, Coll S, Caballero A, García-Buey L, Beltrán J, Benita V, Caballería J, Solá R, Moreno-Otero R, Barrao F, Martín-Duce A, Correa JA, Parés A, Barrao E, García-Magaz I, Puerta JL, Moreno J, Boissard I

- G. Ortiz P, Rodés J. S-adenosylmethionine in alcoholic liver cirrhosis: a randomized, placebo-controlled, double-blind, multicenter clinical trial. *J Hepatol* 1999; 30: 1081-1089.
172. Matthews JR, Botting CH, Panico M, Morris HR, Hay RT. Inhibition of NF- $\kappa$ B DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 2236-2242.
173. Meister A. Glnathione. En: *The Liver: Pathology and pathobiology*, 1998 Second Edition (Ariss IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA 3rd eds. Raven Press, New York: 401-417
174. Melkova Z, Esteban M. Inhibition of vaccinia virus DNA replication by inducible expression of nitric oxide synthase. *J Immunol* 1995; 155: 5711-5718.
175. Meyer M, Caselmann W, Schlittler V, Schreck R, Hofschneider P, Baeuerle P. Hepatitis B virus transactivator MHBst: activation of NF- $\kappa$ B, selective inhibition by antioxidants and integral membrane localization. *EMBO J* 1992; 11: 2991-3001.
176. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: Which, where, how, and why? *J Clin Invest* 1997; 100: 2146-2152.
177. Mihm S, Fayyazi A, Ramadori G. Hepatic expression of inducible nitric oxide synthase transcripts in chronic hepatitis C virus infection: Relation to hepatic viral load and liver injury. *Hepatology* 1997; 26: 451-458.
178. Miles AM, Bohle DS, Glassbrenner PA, Hansert B, Wink DA, Grisham MB. Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. *J Biol Chem* 1996; 271: 40-47.
179. Miller MJ, Sandoval M. Nitric oxide III. A molecular prelude to intestinal inflammation. *Am J Physiol* 1999; 276: G795-G799.
180. Miller RH, Kaneko S, Chung CT, Girones R, Purcell RH. Compact organization of the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 1989; 9: 322-327.
181. Miller RH, Purcell RH. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2057-2061.
182. Mitchell HH, Shonke HA, Grindley HS. The origin of nitrates in the urine. *J Biol Chem* 1916; 24: 461-490.
183. Molina y Vedia L, McDonald B, Reep B, Brune B, Di Silvio M, Billiar TR, Lapettina EG. Nitric oxide-induced S-nitrosilation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzyme activity and increases endogenous ADP-ribosylation. *J Biol Chem* 1992; 267: 24929-24932.
184. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.
185. Moncada S, Higgs A. The arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012.
186. Moncada S, Higgs A, Furchgott R. XIV. International Union of Pharmacology: Nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol Rev* 1997; 49: 137-142.
187. Moreno-Otero R, García-Buey L, Mateos FG, García-Monzón C. Pathogenesis of chronic viral hepatitis: Lessons from immunohistochemistry. *Viral Hepatitis Rev* 1996; 2: 61-79.

188. Mori M, Gotoh T. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 715-719.
189. Morris SM, Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol* 1994; 266: E829-E839.
190. Motb M, Geller AM. Methionine adenosyltransferase: structure and function. *Pharmacol Ther* 1993; 59:125-143.
191. Murakami S. Hepatitis B virus X protein: structure, function and biology. *Intervirology* 1999; 42:81-99.
192. Muscará MN, Wallace JL. Nitric Oxide V. Therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. *Am J Physiol* 1999; 276: G1313-G1316.
193. Muthu-Turkoglu U, Ademoglu E, Turkoglu S, Badur S, Uysal M, Toker G. The effects of interferon-alpha on serum lipid peroxidation and total thiol content in patients with chronic active hepatitis C. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997; 96: 357-361.
194. Nabel GJ, Verma MI. Proposed NF-kappaB/I kappa B family nomenclature (letter). *Genes Dev* 1993; 7: 2063.
195. Naoumov NV, Portmann BC, Tedder RS, Ferns B, Eddleston AL, Alexander GJ, Williams R. Detection of hepatitis B virus antigens in liver tissue. A relation to viral replication and histology in chronic hepatitis B infection. *Gastroenterology*. 1990; 99: 1248-1253.
196. Nathan C. Nitric oxide as secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992;6:3051-3064.
197. Nathan C, Xie Q. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell* 1994a; 78: 915-918.
198. Nathan C, Xie Q. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994b; 269: 13725-13728.
199. Nathan C. Natural resistance and nitric oxide. *Cell* 1995; 82: 873-876.
200. Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: What difference does it make?. *J Clin Invest* 1997; 100: 2417-2423.
201. Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 8841-8848.
202. Natoli G, Avantiaggiati M, Chirillo P, Constanzo A, Artini M, Balsano C, Levrero M. Induction of the DNA-binding activity of c-jun/c-fos heterodimers by the hepatitis B virus transactivator pX. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 989-998.
203. Nussler A, Di Silvio M, Billiar TR, Hoffman RA, Geller DA, Selby R, Madariaga J, Simmons RL. Stimulation of nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J Exp Med* 1992; 176: 261-264.
204. Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 1993; 54: 171-178.
205. Ochoa JB, Udekwu AO, Billiar TR, Curran RD, Cerra FB, Simmons RL, Peitzman AB. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg* 1991; 214: 621-626.

206. Otshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res* 1994; 305: 253-264.
207. Ou J, Molina L, Kim YM, Billiar TR. Excessive NO production does not account for the inhibition of hepatic gluconeogenesis in endotoxemia. *Am J Physiol* 1996; 271: G621-G628.
208. Packer MA, Murphy MP. Peroxynitrite causes calcium efflux from mitochondria which is prevented by Cyclosporin A. *FEBS Lett* 1994; 345: 237-240.
209. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biologic activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 138: 524-526.
210. Palombella VJ, Conner EM, Fuseler JW, Destree A, Davis JM, Laroux FS, Wolf RE, Huang J, Brand S, PJ Elliott, Lazarus D, McCormack T, Barent J, Stein R, Adams J, MB Grisham. Role of the proteasome and NF- $\kappa$ B in streptococcal cell wall-induced polyarthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15671-15676.
211. Parrillo JE. Pathogenetic mechanism of septic shock. *N Engl J Med* 1993; 328: 1471-1477.
212. Petersen J, Dandri M, Burkle A, Zhang L, Rogler CE. Increase in the frequency of hepadnavirus DNA integrations by oxidative DNA damage and inhibition of DNA repair. *J Virol* 1997; 71: 5 455-63.
213. Pittner RA, Spitzer JA. Endotoxin and TNF- $\alpha$  directly stimulate nitric oxide formation in cultured rat hepatocytes from chronically endotoxemic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 185: 430-435.
214. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5193-5197.
215. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 10043-10047.
216. Rahmani Z, Huh KW, Lasher R, Siddiqui A. The hepatitis B virus X protein colocalizes to mitochondria with a human voltage-dependent anion channel, HVDAC3, and alters its transmembrane potential. *J Virol* 2000; 74: 2840-2846.
217. Rao KM. Molecular mechanisms regulation iNOS expression in various cell types. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2000; 3: 27-58.
218. Reiss CS, Komatsu T. Does nitric oxide play a critical role in viral infections? *J Virol* 1998; 72 :4547-4551.
219. Rincón A, Flavell RA. AP-1 transcriptional activity requires both T-cell receptor-mediated and co-stimulatory signals in primary T lymphocytes. *EMBO J* 1994; 13: 4370-4381.
220. Rokey D. The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide. *Hepatology* 1997; 25: 2-5.
221. Rokey DC, Chung JJ. Inducible nitric oxide synthase in rat hepatic lipocytes and the effect of nitric oxide on lipocyte contractility. *J Clin Invest* 1995; 95: 1199-1206.
222. Rokey DC, Chung JJ. Regulation of inducible nitric oxide synthase in hepatic sinusoidal endothelial cells. *Am J Physiol* 1996; 271: G260-G267

223. Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 1998; 114: 344-351.
224. Rodríguez-Ariza A, Paine AJ. Rapid induction of NF- $\kappa$ B binding during liver cell isolation and culture: Inhibition by L-NAME indicates a role of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 145-148.
225. Rodríguez-Pascual F, Hausding M, Ihrig-Biedert I, Furneaux H, Levy AP, Forstermann U, Kleinert H. Complex contribution of the 3'-untranslated region to the expressional regulation of the human inducible nitric oxide synthase gene. Involvement of the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 2000; 275: 26040-26049.
226. Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kayanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman A. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 1994; 269: 26066-26075.
227. Ruiz F, Corrales FJ, Miqueo C, Mato JM. Nitric oxide inactivates rat hepatic methionine adenosyltransferase in vivo by S-nitrosylation. *Hepatology* 1998; 28: 1051-1057.
228. Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T, Kikuchi S, Watanabe Y, Koi S, Onji M, Ohta Y, Choo QL, Houghton M, Kuo G. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6547-6549.
229. Sakurai H, Hisada Y, Ueno M, Sugiura M, Kawashima K, Sugita T. Activation of transcription factor NF- $\kappa$ B in experimental glomerulonephritis in rats. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1316: 132-138.
230. Sax HC, Talamini MA, Hasselgren PO, Rosenblum L, Ogle CK, Fischer JE. Increased synthesis of secreted hepatic proteins during abdominal sepsis. *J Surg Res* 1988; 44:109-116.
231. Schafer DF, Sorrell MF. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1999; 353: 1253-1257.
232. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991; 13: 372-374.
233. Schmid RM, Adler G. NF- $\kappa$ B/Rel/I $\kappa$ B: Implications in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology* 2000; 118: 1208-1228.
234. Schmidt H, Walter U. NO at work. *Cell* 1994; 78: 919-925.
235. Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear Factor- $\kappa$ B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells. *Free Radic Res Commun* 1992; 17: 221-237.
236. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of NF- $\kappa$ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991; 10: 2247-2258.
237. Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with "mini-extracts", prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 6419.
238. Scullard GH, Smith CI, Merigan TC, Robinson WS, Gregory PB. Effects of immunosuppressive therapy on viral markers in chronic active hepatitis B.



Gastroenterology 1981; 81: 987-991.

239. Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 1005-1009.
240. Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res* 1994; 74: 349-353.
241. Seto E, Mitchell P, Yen TB. Transactivation by the hepatitis B virus X protein depends on AP-2 and other transcription factors. *Nature* 1990; 344: 72-74.
242. Shah V, Haddad FG, Garcia-Cardena G, Frangos JA, Mennone A, Grossmann RJ, Sessa WC. Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *J Clin Invest*. 1997; 100: 2923-2930.
243. Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 1986; 64: 659-667.
244. Sherlock S, Dooley J. Chronic hepatitis. *En Diseases of the liver and biliary system*. 10th Ed. Ed. Blackwell Science: 303-335.
245. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NFkappa B. *Annu Rev Cell Biol* 1994; 10: 405-455.
246. Simmonds P. Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 1999; 31 (Suppl 1): 54-60.
247. Sirma H, Weil R, Rosmorduc O, Urban S, Israël A, Kremsdorf D, Bréchet C. Cytosol is the prime compartment of hepatitis B virus X protein where it colocalizes with the proteasome. *Oncogene* 1998; 16, 2051-2063.
248. Slagle BL, Lee TH, Medina D, Finegold MJ, Butel JS. Increased sensitivity to the hepatocarcinogen diethylnitrosamine in transgenic mice carrying the hepatitis B virus X gene. *Mol Carcinog* 1996; 15: 261-269.
249. Spiecker M, Peng HB, Lia JK. Inhibition of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by nitric oxide involves the induction and nuclear translocation of Ikb $\alpha$ . *J Biol. Chem* 1997; 272: 30969-30974.
250. Stadler J, Trockfeld J, Schmalix WA, Brill T, Siewert JR, Greim H, Doehmer J. Inhibition of cytochromes P4501A by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 3559-3563.
251. Staeheli P. Interferon-inducible proteins and the antiviral state. *Adv Virus Res* 1990; 38: 147-160.
252. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992; 258: 1898-1902.
253. Stamler JS. Redox signalling: Nitrosylation and related target interactions of Nitric Oxide. *Cell* 1994; 78: 931-936.
254. Steinle AU, Weidenbach H, Wagner M, Adler G, Schmid RM. NF-kappaB/Rel activation in cerulein pancreatitis. *Gastroenterology* 1999; 116: 420-430.
255. Stuerh DJ, Marietta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: Mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 7738-7742.

256. Su F, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates transcription factor NF- $\kappa$ B by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of rel-related proteins. *J Virol* 1996; 70: 4558-4566.
257. Su Q, Shroder C, Hofmann W, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P. Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1998; 27: 1109-1120.
258. Swietek K, Juszczyk J. Reduced glutathione concentration in erythrocytes of patients with acute and chronic viral hepatitis. *J Viral Hepat* 1997; 4: 139-41.
259. Szabo C, Southan GJ, Thiemermann C. Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiourea sulfate, a potent a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12472-12476.
260. Szabo C, Ohshima H. DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide* 1997; 1: 373-385.
261. Szabo C. DNA strand breakage and activation of poly-ADP ribosyltransferase: a cytotoxic pathway triggered by peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 855-869.
262. Szabo C, Salzman AL, Ischiropoulos H. Related Articles Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123 occurs in early stages of endotoxic and hemorrhagic shock and ischemia-reperfusion injury. *FEBS Lett* 1995; 372: 229-232.
263. Takada S, Shirakata Y, Kaneniwa N, Koike K. Association of hepatitis B virus X protein with mitochondria causes mitochondrial aggregation at the nuclear periphery, leading to cell death. *Oncogene* 1999; 18: 6965-6973.
264. Tamir S, Tannenbaum SR. The role of nitric oxide (NO) in the carcinogenic process. *Biochimica Biophysica Acta* 1996; 1288: F31-F36
265. Taylor BS, Alarcon LH, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase in the liver: Regulation and function. *Biochemistry (Mosc)* 1998a; 63: 766-781.
266. Taylor BS, de Vera ME, Ganster RW, Wang Q, Shapiro RA, Morris SM, Billiar T, Geller DA. Multiple NF- $\kappa$ B enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide gene. *J Biol Chem* 1998b; 273: 15148-15156.
267. Taylor BS, Geller DA. Molecular regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Shock* 2000; 13 :413-424.
268. Tülg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nölchen B, Judmaier G, Huber CH. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1992; 103: 264-274.
269. Traenckner EB, Pahl HL, Henkel T, Schmidt KN, Wilk S, Baeuerle PA. Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J* 1995; 14: 2876-2883.
270. Truant R, Antunovic J, Greenblatt J, Prives C, Cromlish JA. Direct Interaction of the Hepatitis B Virus HBx protein with p53 leads to inhibition by HBx of p53 response element-directed transactivation. *J Virol* 1995; 69: 1851-1859.
271. Twu J, Lang M, Chen D, Robinson W. Activation of protooncogene c-jun by the X protein of Hepatitis B virus. *Virology* 1993; 192: 346-350.
272. Vendemiale G, Altomare E, Trizio T, Le Grazie C, Di Padova C, Salerno MT,

- Carrieri V. Effect of oral S-adenosyl-L-methionine on hepatic glutathione in patients with liver disease. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24: 407-415.
273. Vincent JL, Zhang H, Szabo C, Preiser JC. Effect of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1781-1785.
274. Vouidoukis I, Mazier D, Debre P, Mossalayi MD. Nitric oxide and human infectious diseases. *Res Immunol* 1995; 146: 689-692.
275. Wang H, Gao X, Fukumoto S, Tademoto S, Sato K, Hirai K. Post-isolation inducible nitric oxide synthase expression due to collagenase buffer perfusion and characterization of the gene regulation in primary cultured murine hepatocytes. *J Biochem (Tokyo)* 1998; 124: 892-899.
276. Watson WH, Zhao Y, Chawla RK. S-adenosylmethionine attenuates the lipopolysaccharide-induced expression of the gene for tumour necrosis factor  $\alpha$ . *Biochem J* 1999; 342: 21-25.
277. Wei X, Charles I, Smith A, Ure J, Feng G, Huang F, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew F. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 375: 408-411.
278. Weil R, Sirma H, Giannini C, Kremsdorf D, Bessia C, Dargemont C, Br  chet C, Isra  l. Direct association and nuclear import of the hepatitis B virus X protein with NF- $\kappa$ B inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$ . *Mol Cell Biol* 1999; 19: 6345-6354.
279. Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5212-5216.
280. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Eng J Med* 1989; 320: 365-376.
281. Wink DA, Mitchell JB. The chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cyto-toxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 434-456.
282. Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allen JS, Keefer LK. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 1991; 254: 1001-1003.
283. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF- $\kappa$ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1994; 269: 4705-4708.
284. Xie QW, Whisart R, Nathan C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon-gamma and bacterial lipopoly-saccharide. *J Exp Med* 1993; 177: 1779-1784.
285. Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med* 2000; 6: 347-373.
286. Zaragoza C, Ocampo CJ, Saura M, McMillan A, Lowenstein CJ. Nitric oxide inhibition of coxsackie virus replication in vitro. *J Clin Invest* 1997; 100: 1760-1767.
287. Zhang C, Walker LM, Hinson JA, Mayeux PR. Oxidant stress in rat liver after lipopoly-saccharide administration: Effect of inducible nitric-oxide synthase inhibition. *J Pharmacol Exp Therap* 2000; 293: 968-972.
288. Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Granger HJ, Geppetti P, Ledda F. Nitric oxide promotes DNA synthesis and cyclic GMP formation in endothelial cells from

postcapillary venules. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192:1198-1203.

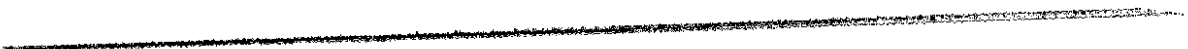
289. Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, Ledda F. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest* 1994; 94:2036-2044.

***PUBLICACIONES***

**PUBLICACIONES**

1. **P.L. Majano**, C. García-Monzón, M. López-Cabrera, E. Lara-Pezzi, E. Fernández Ruiz, C. García-Iglesias, M.J. Borque, R. Moreno Otero. Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis: Evidence for a virus-induced gene up-regulation. *Journal of Clinical Investigation* 1998; 101: 1343-1352.
2. **P.L. Majano**, Lara-Pezzi E, López-Cabrera M, Apolinario A, R. Moreno Otero, García-Monzón C. Hepatitis B virus X (HBx) induces inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene promoter through the proximal NF- $\kappa$ B-binding site: cytoplasmic location of HBx is essential for iNOS promoter induction. *Hepatology* (sometido).
3. **P.L. Majano**, C. García-Monzón, F.J. Corrales, Mato JM, E. García-Trevijano, J. Cámara, P. Ortiz, M.A. Avila , R. Moreno Otero. Modulation of hepatic inducible nitric oxide synthase expression by S-adenosylmethionine. *Hepatology* (sometido).
4. C. García Monzón, L. García Buey, **P.L. Majano**, R. Moreno Otero. Integrins: structure, biological functions and relevance in viral chronic hepatitis. *European Journal of Clinical Investigation* 1995;25:71-78.
5. C. García-Monzón , **P.L. Majano**, J. A. Solís, S. Rodríguez, F. Colina, M. López-Botet, E. Moreno-González, R. Moreno-Otero. Intrahepatic enhanced expression of a  $\beta$ 2-microglobulin conformational epitope in acute rejection: Evidence of modulation by glucocorticoids. *Digestive Diseases and Sciences* 1998. Vol 43, nº 8 1755-1762.
6. E. Lara-Pezzi, **P.L. Majano**, M. Gómez-Gonzalo, C. García -Monzón, Ricardo Moreno Otero , M. López Cabrera. The hepatitis B virus X protein up-regulates tumor necrosis factor- $\alpha$  gene expression in hepatocytes. *Hepatology* 1998. 28; 1013-1021.
7. E. Lara-Pezzi, A.L. Arnesilla, **P.L. Majano**, J.M. Redondo, M. López-Cabrera. The hepatitis B virus X activates nuclear factor of activated T cells (NF-AT) by a cyclosporin A-sensitive pathway. *EMBO J.* 1998; 17: 7066-7077.
8. C. García-Monzón, **P.L. Majano**, I. Zubia-Lauzurica, P. Sanz, A. Apolinario, R. Moreno Otero. Intrahepatic accumulation of nitrotyrosine in chronic viral hepatitis evidence for nitric oxide-related liver damage. *Journal of Hepatology.* 2000; 32: 331-338.
9. C. García-Monzón, E. Martín.Pérez, O. Iacono, M. Fernández-Bermejo, **P.L. Majano**, A. Apolinario, E. Larrañaga, R. Moreno Otero. Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated to obesity. *Journal of Hepatology.* 2000; 33: 716-724.

10. M. Romero, C. García-Monzón, G. Clemente, M. Salcedo, E. Alvarez, P.L. Majano, R. Moreno-Otero. Intrahepatic expression of inducible synthase in acute allograft rejection: evidence of modulation by corticosteroids. *Liver Transplantation* 2001; 7: 16-21.
11. E. Lara-Pezzi, P.L. Majano, M. Yáñez-Mo, M. Gómez-Gonzalo, M. Carretero, R. Moreno-Otero, F. Sánchez-Madrid, M. López Cabrera. Effect of the hepatitis B virus HBx on protein-mediated adhesion to and migration on extracellular matrix. *Journal of Hepatology* (en prensa).
12. P. Boya, E. Larrea, I. Sola, P. L. Majano, C. Jiménez, M. P. Civeira, J. Prieto. NF- $\kappa$ B in the liver of patients with chronic hepatitis C: relationship between RelA expression and disease progression. *Hepatology* (sometido).
13. J. Medina, L. Caveda, C. García-Monzón, A. García Arroyo, , P. L. Majano, O Lo Iacono, L. García-Buey, F. Sánchez-Madrid, R. Moreno Otero. Molecular mechanism of hepatocyte growth factor (HGF) angiogenic effects in human endothelial cells. Relevance in chronic hepatitis C-associated neoangiogenesis. *Hepatology* (sometido).



***ANEXOS***



# Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Chronic Viral Hepatitis

## Evidence for a Virus-Induced Gene Upregulation

Pedro L. Majano,\* Carmelo García-Monzón,\* Manuel López-Cabrera,† Enrique Lara-Pezzi,† Elena Fernández-Ruiz,† Consuelo García-Iglesias,\* María J. Borque,† and Ricardo Moreno-Otero\*

\*Liver Unit and †Molecular Biology Unit, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, 28006 Madrid, Spain

### Abstract

Increased nitric oxide (NO) production may contribute to pathological changes featuring in some inflammatory diseases, but the role of NO in chronic viral hepatitis is still unknown. We compared the inducible NO synthase (NOS2) expression in the liver of patients with chronic viral hepatitis with that of both nonviral liver disease and histologically normal liver. NOS2 expression was assessed by immunohistochemical and in situ hybridization studies of liver biopsy sections. An intense hepatocellular NOS2 reactivity was detected in chronic viral hepatitis, whereas it was weakly or not observed in nonviral liver disease or normal liver, respectively. In addition, we determined whether the hepatitis virus (HBV) might regulate the synthesis of this enzyme. NOS2 mRNA and protein levels as well as enzyme activity were assessed in cytokine-stimulated HBV-transfected and nontransfected hepatoma cells. Transfection with either HBV genome or HBV X gene resulted in induction of NOS2 mRNA expression, and the maximal induction of this transcript and NO production was observed in cytokine-stimulated HBV-transfected cells. These results indicate that hepatotropic viral infections are able to upregulate the NOS2 gene expression in human hepatocytes, suggesting that NO may mediate important pathogenic events in the course of chronic viral hepatitis. (*J. Clin. Invest.* 1998; 101: 1343-1352.) **Key words:** nitric oxide • nitric oxide synthase • hepatitis B virus • hepatitis C virus • hepatocellular carcinoma

### Introduction

Nitric oxide (NO) is a highly reactive gaseous molecule produced by a wide variety of eukaryotic cells, from the guanidino nitrogen of L-arginine, by the action of the enzyme NO synthase (NOS) (1-3). There are two isoforms of constitutive NOS which are expressed in neurons (NOS1) and endothelial cells (NOS3), generating small amounts of NO (4, 5). The inducible isoform (NOS2) can be expressed de novo by many

cell types, including macrophages (6) and hepatocytes (7), after induction with bacterial endotoxin and proinflammatory cytokines (8, 9), thus producing large quantities of NO.

NO has been implicated as a mediator of immune and inflammatory responses (10). Increased tissue NOS2 expression and NO production have been observed in distinct animal models, such as in the brain of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (11) and in kidneys from a murine lupus model (12). More recently, different authors have reported that increased NOS2 expression and NO generation may contribute to the pathological changes featuring in rheumatoid arthritis (13-15) and Alzheimer's disease (16).

Chronic viral hepatitis (CVH) is characterized by a parenchymal infiltration of activated cytotoxic T lymphocytes, regarded as the main cause of hepatic injury (17). Moreover, the existence of an intrahepatic upregulatory process involving adhesion molecules, such as intercellular adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1 (18, 19), and certain proinflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  (20) and IFN- $\gamma$  (21), has been well documented. Interestingly, Geller et al. (22) demonstrated that proinflammatory cytokines play a central role in the hepatocellular NOS2 upregulation, inducing NO production in human hepatocytes. To examine the potential role of NO in the pathogenesis of liver disease caused by HBV and HCV, we assessed the NOS2 expression pattern in the liver tissue from patients with CVH, searching for correlations between the expression level of this enzyme and the histological inflammatory activity of liver disease. In addition, due to the fact that HBV, through its transactivator protein X (HBx), is capable of upregulating different cellular genes (23, 24), we investigated whether HBV could upregulate the NOS2 gene expression in cultured hepatocyte-derived cells.

### Methods

#### Patients

The study included 44 CVH patients with liver biopsy findings compatible, according to internationally accepted criteria (25), with chronic active hepatitis (CAH). CAH type B (CAHB) was diagnosed in 15 patients, and CAH type C (CAHC) in 29. The diagnostic criteria for viral hepatitis included persistent elevation of serum alanine aminotransferase levels and either the positivity of both hepatitis B surface antigen (HBsAg) and HBV DNA in the serum of patients with CAHB, or the presence of both antibodies to HCV (anti-HCV) and HCV RNA in the serum of patients with CAHC, > 6 mo before

Address correspondence to Dr. Carmelo García-Monzón, Unidad de Hepatología (planta 3), Hospital de la Princesa, C/ Diego de León, 62, 28006 Madrid, Spain. Phone: 341-309-3911; FAX: 341-401-3582; e-mail: garciamonzon@hotmail.com

Received for publication 30 May 1997 and accepted in revised form 2 February 1998.

*J. Clin. Invest.*

© The American Society for Clinical Investigation, Inc.

0895-9738/98/104/1343/10 \$2.00

Volume 101, Number 7, April 1998, 1343-1352

http://www.jci.org

1. **Abbreviations used in this paper:** CAH, chronic active hepatitis; CM, cytokine mixture plus LPS; CVH, chronic viral hepatitis; G3PDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HBsAg, hepatitis B surface antigen; HBV, hepatitis B virus; HBx, HBV protein X; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus; HI, hepatitis index; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; RT, reverse transcription.

undergoing liver biopsy. Liver tissues from 12 alcoholic patients (8 with histological features of steatosis, and 4 with cirrhosis), 14 patients with histological changes of cholestasis (mild portal inflammation and/or ductular hyperplasia), and 8 patients with histologically normal liver were also studied as controls for immunohistochemical and *in situ* hybridization analysis. Patients with alcoholism included in this study consumed > 80 g/d of ethanol for > 10 yr, and a percutaneous liver biopsy was performed on each one for diagnostic purposes. Liver biopsy samples with histopathological features of cholestasis or with nonspecific histological reactive changes (normal liver) were obtained during abdominal surgery for noncomplicated cholelithiasis. All of these control patients were negative for HBsAg and anti-HCV, and both CVH and control patients lacked antibodies to HIV (anti-HIV). Finally, samples from 10 of 44 patients with CVH included in this study (4 with CAHB and 6 with CAHC), 3 of 12 patients with alcoholic liver disease (steatosis), 4 of 14 patients with cholestasis, and 4 of 8 cases with histologically normal liver were randomly chosen for *in situ* hybridization analysis.

#### Viral markers

HBsAg and anti-HIV were determined by commercially available enzyme immunoassay kits (Abbott Laboratories, North Chicago, IL). HBV DNA was tested by a commercial immunoassay kit (Hybrid Capture system; Murex Diagnostics S.A., Madrid, Spain). Anti-HCV was detected using a commercially available second-generation enzyme-linked immunosorbent assay kit (Ortho Diagnostic Systems, Inc., Raritan, NJ). HCV RNA was detected by a nested PCR technique using primers from the highly conserved 5' noncoding region of the HCV genome, as described elsewhere (26).

#### Liver tissue studies

Liver biopsy samples from CVH and alcoholic patients were obtained, after informed written consent, using a Menghini needle by a percutaneous route. Liver samples from patients with histopathological features of cholestasis or nonspecific histological reactive changes were obtained, after informed written consent, during laparotomy for noncomplicated cholecystectomy.

**Liver histology.** Liver biopsy specimens were evaluated by the same pathologist, recording the conventional histological diagnoses and, in the biopsy sections from patients with virus-induced chronic liver disease, the histological activity index, subscored for hepatitic index (HI; portal, periportal, and lobular inflammation) and fibrotic index, described by Knodell et al. (27).

**Immunohistochemical analysis.** Cryostat liver sections were incubated with an IgG2a mAb that recognizes a 21-kD protein fragment corresponding to amino acids 961–1144 of mouse macrophage NOS2 (Transduction Laboratories, Lexington, KY) at a working concentration of 1 µg/ml. Given that this anti-NOS2 mAb cross-reacts with the neuronal constitutive isoform of NOS (NOS1) (28), we used a polyclonal anti-human NOS1 antibody which recognizes a 22.3-kD protein fragment corresponding to amino acids 1095–1289 of human NOS1 (Transduction Laboratories) at a working concentration of 1 µg/ml as an internal control in all immunostaining experiments. Furthermore, all tissue sections were also incubated with the TEA 3/1 (IgG2a) anti-E-selectin mAb (19) and a rabbit anti-mouse antiserum (Dakopatts A/S, Copenhagen, Denmark), both at a working concentration of 1 µg/ml, and were used as negative controls. Finally, each section was evaluated semiquantitatively under code as detailed elsewhere (18).

**RNA probes.** A 700-bp SphI-BamHI cDNA fragment of human hepatocyte NOS2 (kindly provided by Dr. David A. Geller, Department of Surgery, University of Pittsburgh) cloned into pGEM-3Z (Promega Corp., Madison, WI) was used as a template to generate digoxigenin-labeled sense and antisense RNA probes, as described previously (29). A 350-bp fragment of the rat serum albumin cDNA was used as a positive control for hybridization on hepatocytes.

**In situ hybridization technique.** Paraffin-embedded liver sections were fixed in freshly prepared 4% paraformaldehyde for 20 min, di-

gested 12 min with 25 µg/ml proteinase K (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), and hybridized overnight at 45°C with a preheated (75°C, 5 min) hybridization mixture of 50% formamide, 2× SSC, 1 mM EDTA, 250 µg/ml yeast tRNA, 0.1% 3-[3-(trifluoromethyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CTTAPS), and 2.5 µg/ml of digoxigenin-labeled RNA probe. After three posthybridization washings in 50% formamide, 2× SSC, and 0.1% CTTAPS at 50°C, sections were treated once with 20 ng/ml ribonuclease A (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in 2× SSC at 37°C for 20 min. After the same posthybridization washes, probe binding was visualized with an alkaline phosphatase-conjugated antidigoxigenin antibody (Boehringer Mannheim) diluted at 1:500, and color was achieved by adding a substrate solution as described previously (29). Finally, liver sections were counterstained with nuclear Fast Red (Sigma Chemical Co.) and mounted by standard methods.

#### Cell culture and cytokine activation

Human hepatoma HepG2 cells and the 2.2.15 cell line, which is a stably transfected derivative of HepG2 cells developed by transfection with a dimerized HBV genome (30), were grown in phenol red-free DMEM (BioWhittaker, Inc., Walkersville, MD) supplemented with 5 µg/ml L-glutamine, gentamicin (20 mg/ml), 10% heat-inactivated FCS, and 0.5 mM L-arginine hydrochloride (Sigma Chemical Co.). Once in culture dishes were subconfluent (~5 × 10<sup>6</sup> cells), the medium was changed, and cells were incubated with a mixture of 1 µg/ml of LPS (*Escherichia coli* 011:B4; Sigma Chemical Co.), 250 U/ml human recombinant IL-1β (Genzyme Corp., Boston, MA), 250 U/ml human recombinant TNF-α (Genzyme Corp.), and 250 U/ml human recombinant IFN-γ (Genzyme Corp.) for 6, 12, 24, and 48 h.

#### RNA isolation and Northern blot analysis

Total RNA was extracted from cultured cells using the ULTRASPEC<sup>®</sup> RNA isolation system (Biotecx Laboratories, Houston, TX). Aliquots containing 15 µg of RNA from each cell sample were run on 1% formaldehyde/agarose gels, transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham International, Little Chalfont, Bucks, UK), and cross-linked by ultraviolet autocross-linking (UV Stratalinker 1800; Stratagene Inc., La Jolla, CA). Membranes were hybridized overnight at 42°C with a 2.1-kb probe from the human hepatocyte NOS2 cDNA. The hybridized filters were washed at 65°C, and autoradiography was performed at -70°C in the presence of intensifying screens.

For dot blot hybridization experiments, the RNA samples were loaded onto the nitrocellulose membranes following the manufacturer's instructions for the Bio-Dot<sup>®</sup> SF microfiltration apparatus (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA), as described above. Dot blot membranes were washed and hybridized with a probe for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH), a constitutively expressed gene in these cells, to control for variations in the amount of total RNA per lane. Relative mRNA levels were quantitated by PhosphorImager scanning using ImageQuant software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

#### Western blot analysis

Cells were resuspended in 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, and 5 µg/ml pepstatin A, and an equal volume of 2× SDS loading buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0.02% bromophenol blue, 10% glycerol, 1% β-mercaptoethanol) was added. The cytosolic fraction was obtained by centrifugation at 13,000 g for 20 min at 4°C. Protein samples (50 µg) were electrophoresed under reducing conditions on 7.5 or 10% SDS-PAGE gels, blotted onto nitrocellulose membranes (Amersham International), and probed with polyclonal anti-NOS2 antibody (Transduction Laboratories) at 1:500 or polyclonal anti-actin antibody (Sigma Chemical Co.) at 1:1,000 followed by a goat anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase (Pierce & Warriner Chemical Co., Rockford, IL). Blots were developed by enhanced chemiluminescence (Amersham International). Cell lysates from the murine macrophage cell line RAW 264.7 provided by the manufacturer (Transduction Laboratories) were used as a positive control.

### Nitric oxide measurements

To determine the amount of NO produced by the HepG2 and 2.2.15 cell lines under the different cytokine-mediated activation conditions, the culture supernatants were tested for the stable end product, nitrite, using an automated procedure based on the Griess reaction (31).

### Plasmids

The plasmid pHBV containing the entire HBV genome inserted in the EcoRI site of pSP65 plasmid vector (Promega Corp.) was a gift from Dr. Aleem Siddiqui (University of Colorado Health Sciences Center, Denver, CO). The recombinant plasmids psV-X, psV-H, and psV- $\beta$  Gal were kindly provided by Dr. Masumo Levrero (I Clinica Medica and Fondazione Andrea Cesalpino, Policlinico Umberto I, Rome, Italy). They contain the complete HBV X, hygromycin, and  $\beta$ -galactosidase open reading frames, respectively, under the control of the 5'40 enhancer/early promoter element.

### Cell lines, transfection, and PCR analysis

The human hepatoma cell lines HepG2 and Hep3B, and the human nonneoplastic hepatocyte-derived cell line termed CCL13 obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD) were used. HepG2 and CCL13 cells are negative for HBV DNA, whereas Hep3B cells express the HBsAg alone. Transient transfection of these cell lines, plated at a density of  $3 \times 10^5$  cells, were performed in 30-min dishes using the DOSPER liposomal transfection reagent (Boehringer Mannheim) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were exposed to serum-free medium containing 5  $\mu$ g of plasmid DNA and 20  $\mu$ g of the liposome preparation for 6 h, washed, and cultured in DMEM (BioWhittaker, Inc.) supplemented with 10% FCS for 36 h. Total RNA (0.5  $\mu$ g) from transfected cells was reverse transcribed and amplified by PCR using specific primers for NOS2 and  $\beta$ -actin cDNAs and a Gene Amp RNA PCR core kit (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT), as recommended by the manufacturer. The primers specific for NOS2 were 5'-TGCCAGATGGAGCATCAGA-3' (sense) and 5'-ACTTCCTCCAGGATGTGGTA-3' (antisense) (Perkin-Elmer Corp.), and yielded a specific 230-bp PCR product. The primers specific for  $\beta$ -actin were 5'-ATCTGGCACCACCCTTCTACAATGAGCTGCC-3' (sense) and 5'-CGTCATACTCTGCTGTGCTGATCCACATCTTGC-3' (antisense) (Clontech, Palo Alto, CA), and yielded a 838-bp product. The amplification reactions for NOS2 consisted of 25, 30, 35, and 40 cycles at 95°C for 1 min, annealing at 50°C for 1 min, and extension at 72°C for 30 s. The amplification reactions for  $\beta$ -actin consisted of 15, 20, 25, and 30 cycles at 95°C for 1 min, annealing at 60°C for 1 min, and extension at 72°C for 90 s. The products were separated by agarose electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining. The specificity of the amplified bands was validated by their predicted size. In addition, the 370-bp PCR product was sequenced (Amersham International) and found to be identical to that predicted from human hepatocyte NOS2 (7).

### Statistical analysis

Data are presented as mean  $\pm$  SEM. The significance of differences was determined using the Mann-Whitney U test for nonparametric data from immunohistochemical analysis and the Student's *t* test for data from both NOS2 mRNA and nitrite levels. Statistical significance was established at a *P* value < 0.05.

## Results

**Intrahepatic NOS2 expression pattern.** We found a marked expression of NOS2 in liver sections from patients with both chronic HBV and HCV infections. NOS2 immunoreactivity was observed mainly in hepatocytes, showing a predominant cytoplasmic staining, with the positive liver cells distributed diffusely throughout the hepatic lobules and with a similar pattern in both types of CVH studied (Fig. 1, A and B). In con-

trast, a low level of NOS2 immunoreactivity was observed in hepatocytes from patients with both alcoholic steatosis and cholestasis (Fig. 1 C), restricted to some liver cells located mainly in perivenular and periportal areas. It was noticeable that in normal liver tissue, the expression of NOS2 was always negative (Fig. 1 B). In addition, in all liver sections studied, no NOS2 staining was observed in liver-infiltrating mononuclear cells, vascular endothelium, or sinusoidal lining cells. Because the anti-mouse macrophage NOS2 mAb cross-reacts with the neuronal constitutive NOS (NOS1) (27), we carried out immunostaining experiments with a polyclonal anti-human NOS1 antibody. Interestingly, no NOS1 immunoreactivity was observed in any of the liver sections studied (Fig. 1 E). This finding clearly indicates that the marked hepatocellular staining obtained with the anti-NOS2 mAb is due to a specific binding to the human hepatocyte NOS2. Using the TEA 3/1 mAb (Fig. 1 F) and a rabbit anti-mouse antiserum as negative controls, no hepatic staining was obtained.

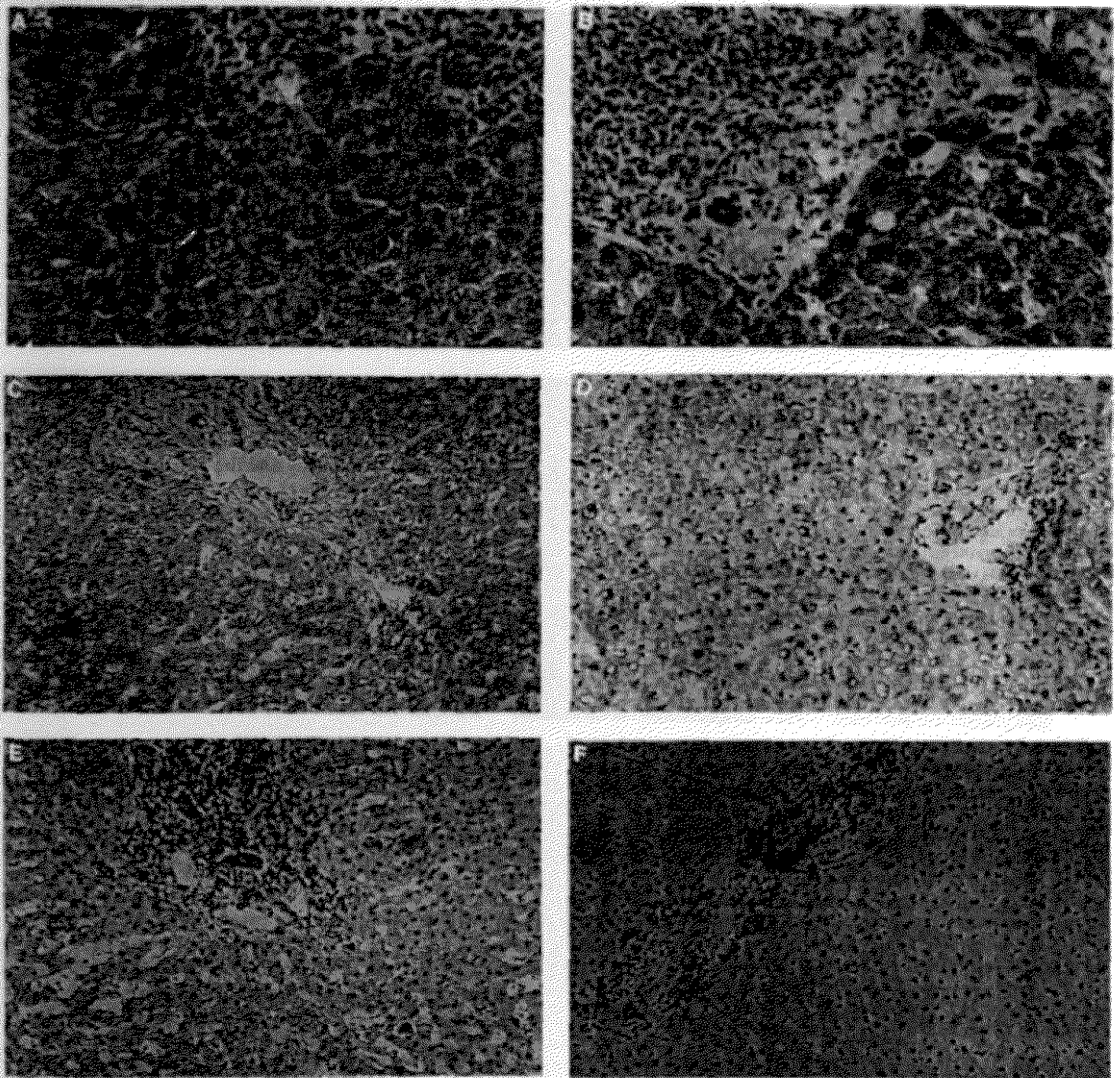
Searching for possible correlations between the hepatocellular NOS2 staining intensity and the inflammatory activity of CVH, we first classified liver samples from these patients into two groups according to their hepatic score (portal, periportal, and lobular inflammation) of the Knodell's index. Thus, five liver biopsies with CAHB and nine with CAHC had a low HI (< 5), whereas the group with a high HI (> 10) was comprised of six liver biopsies with CAHB and 14 with CAHC. We then carried out a comparative statistical analysis between the semiquantitative NOS2 staining score found in the mentioned groups of CVH and in alcoholic and cholestatic patients, whose data are shown in Table 1. To summarize, no significant difference in the intrahepatic NOS2 distribution pattern and staining score between CAHB and CAHC was found, but this difference reached statistical significance compared with that obtained in the liver tissue from patients with alcoholic liver disease (*P* < 0.05) or cholestasis (*P* < 0.01).

In situ hybridization experiments using a specific antisense RNA probe showed the presence of high NOS2 mRNA levels in liver sections from both CAHB and CAHC. A strong expression of NOS2 mRNA was observed in hepatocytes (Fig. 2, A and B), with a pattern resembling that obtained in immunohistochemical studies. Some positive cells for NOS2 mRNA were also found in the mononuclear cell infiltrate and vascular endothelium (Fig. 2 C), a finding that contrasted with the absence of NOS2 immunoreactivity in these cells. In contrast, low levels of NOS2 mRNA were detected in liver sections

Table 1. Comparative Immunohistochemical Scoring of NOS2 Expression

	Low HI (< 5)		High HI (> 10)	
CAHB	n = 5	2.2 $\pm$ 1	n = 6	2.6 $\pm$ 0.8
CAHC	n = 9	2.3 $\pm$ 1	n = 14	2.6 $\pm$ 0.8
ALD	n = 9	1.6 $\pm$ 1*		
CHL	n = 10	1.2 $\pm$ 0.6**		

Data are expressed as median values  $\pm$  SD. Scoring system: 0, negative staining; 1, focal and weak staining; 3, diffuse and strong staining. ALD, Alcoholic liver disease; CHL, Cholestasis. \**P* < 0.05 vs. both CAHB and CAHC. \*\**P* < 0.01 vs. both CAHB and CAHC.

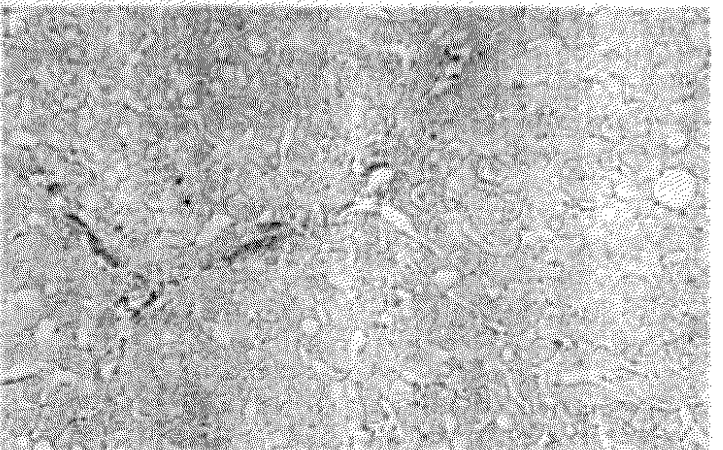
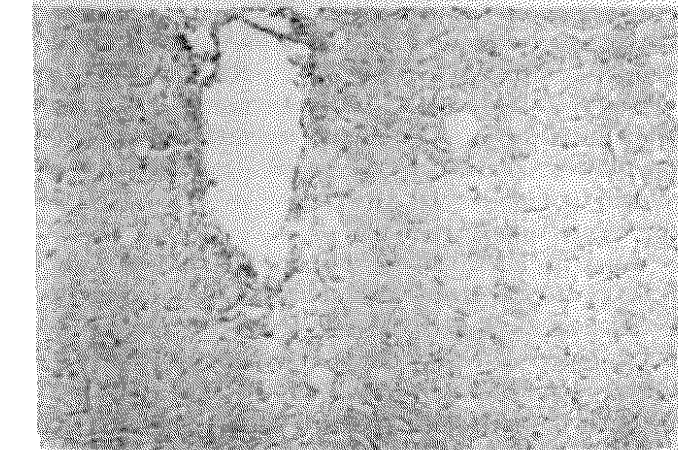
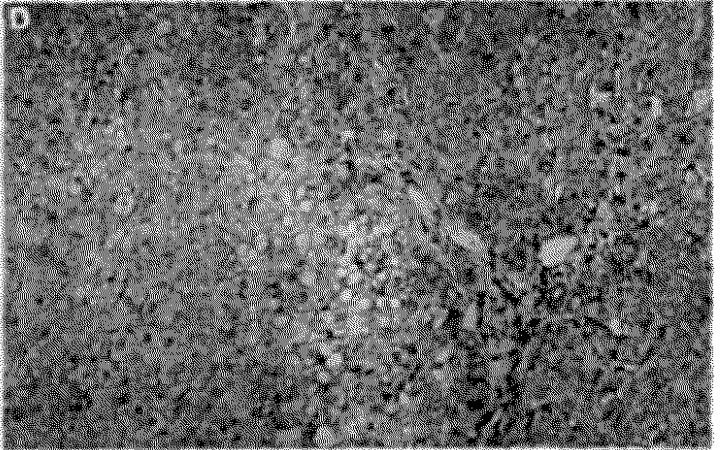
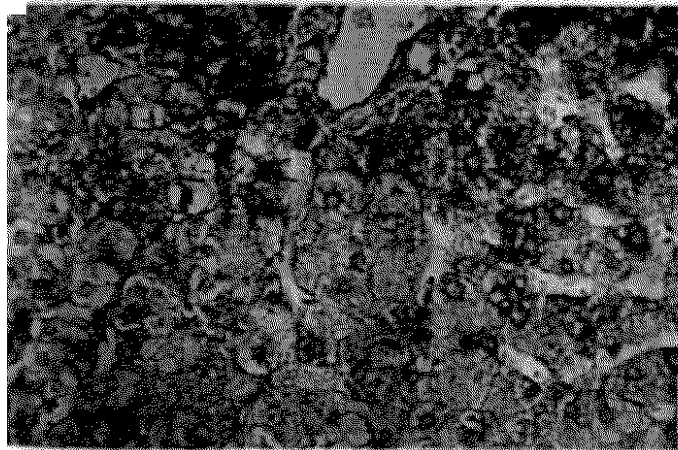
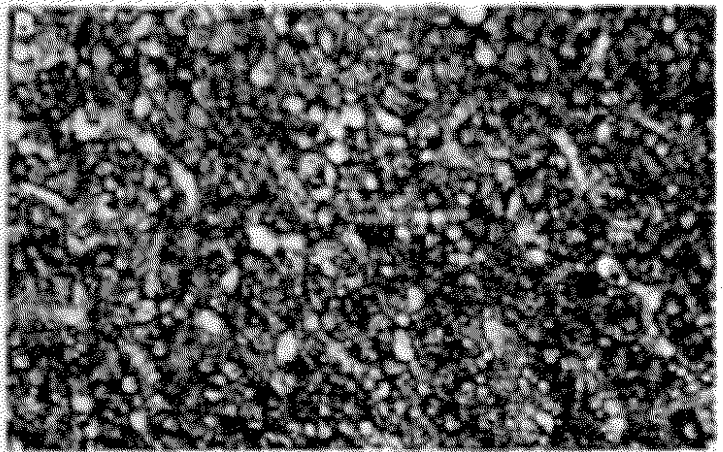
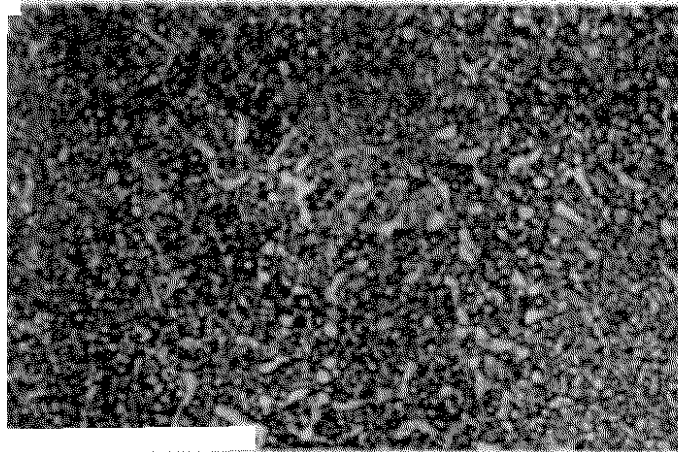


**Figure 1.** Immunohistochemical detection of NOS2 in liver sections. An intense immunoreactivity to NOS2 is shown in the liver tissue from a patient with chronic HBV with a low HI (A, original magnification  $\times 500$ ), and from a patient with chronic HCV with a low HI (B, original magnification  $\times 500$ ). By contrast, a weak hepatocellular expression of NOS2 is observed in the liver sample from a patient with cholelithiasis-related cholestasis (C, original magnification  $\times 300$ ). Interestingly, no NOS2 expression is found in histologically normal liver (D, original magnification  $\times 300$ ). Noticeably, no NOS2 immunoreactivity is detected in hepatocytes from a patient with chronic HBV (E, original magnification  $\times 300$ ). The negative control (IgG2a, TEA 3/1 anti-E-selectin mAb) of immunoperoxidase staining is also shown (F, original magnification  $\times 300$ ).

from alcoholic steatosis (Fig. 2D) and cholestasis (Fig. 2E). In these tissue samples, the NOS2 mRNA-expressing cells were also hepatocytes but were restricted to perivenular and periportal areas. It was interesting to note that no expression of NOS2 mRNA was found in histologically normal livers (Fig. 2F). Finally, in sections hybridized with sense NOS2 RNA probe, no positive signals were observed (data not shown).

**HBV induces NOS2 gene upregulation.** Northern blot anal-

ysis was performed to detect NOS2 mRNA expression in the human hepatoma cell line HepG2 and in the HepG2-derived cell line stably transfected with the HBV genome termed 2.2.15, either with or without stimulation with LPS and a combination of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IFN- $\gamma$  (LPS plus cytokine mixture [CM]). A single and specific transcript was detected  $\sim 4.5$  kb, the strongest band seen in CM-stimulated 2.2.15 cells (Fig. 3A, lane 4). To quantitate NOS2 mRNA levels, we ca-

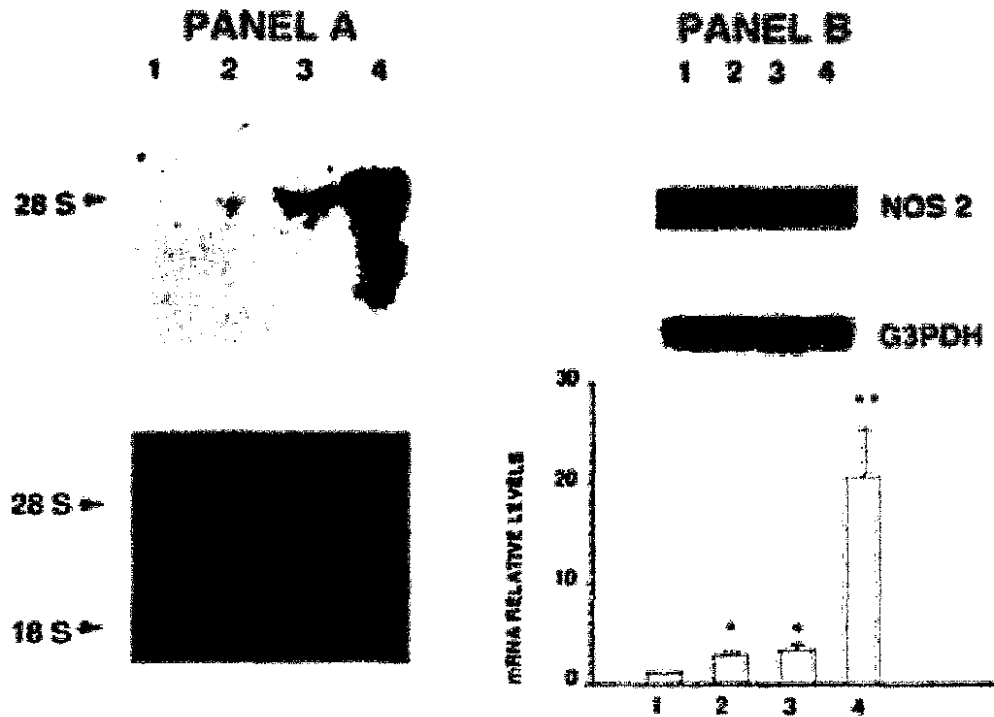


**Fig. 2.** In situ detection of NOS2 mRNA using a nonradioactive antisense RNA probe. A marked expression of the NOS2 mRNA is shown in hepatocytes from a patient with chronic HCV (A, original magnification  $\times 300$ ; B, original magnification  $\times 500$ ). Positivity for NOS2 mRNA is found in the central venous endothelium from the same patient (C, original magnification  $\times 500$ ). By contrast, only a few NOS2 mRNA-expressing hepatocytes are observed in the liver tissue from a patient with alcoholic steatosis (D, original magnification  $\times 300$ ), and from a patient with cholelithiasis-related cholestasis (E, original magnification  $\times 300$ ). In histologically normal liver, no NOS2 mRNA-expressing cells are found (F, original magnification  $\times 300$ ).

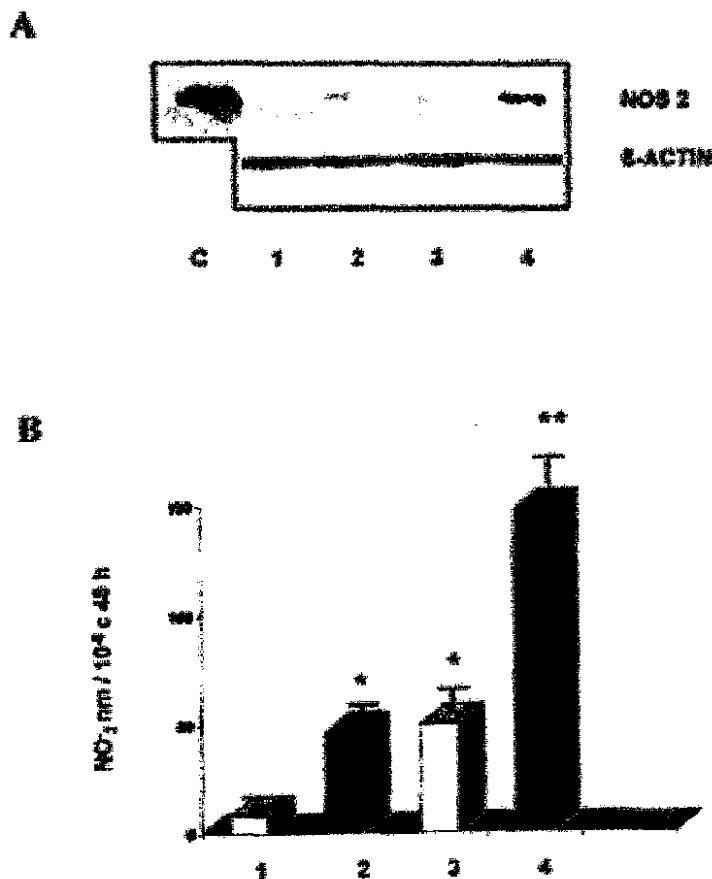
dot blot hybridization analysis using RNA samples under the same experimental conditions described above (Fig. 1). In unstimulated (resting) HepG2 cells (lane 1), NOS2 mRNA was almost undetectable, but was induced after 12 h of stimulation (approximately threefold induction,  $P < 0.05$  vs. resting HepG2 cells) (lane 2). In contrast, resting 2.2.15 cells (lane 3) expressed higher (approximately fourfold,  $P < 0.05$ ) NOS2 mRNA levels than resting HepG2 cells and thus to

a similar extent as CM-activated HepG2 cells. More interestingly, 2.2.15 cells expressed still higher ( $\sim 21$ -fold induction,  $P < 0.01$  vs. resting HepG2 cells) NOS2 mRNA levels when stimulated with CM (lane 4). Subsequent probing for G3PDH mRNA showed relatively equal loading of RNA samples.

To compare NOS2 protein levels with NOS2 enzyme activity, we examined protein levels by Western blot and cellular NO release by assaying culture supernatant nitrite levels after



**Figure 3.** NOS2 mRNA levels in HepG2 and 2.2.15 hepatoma cell lines after 12 h stimulation with CM (Northern blot, **PANEL A**; dot blot, **PANEL B, top**). Lane 1, Resting HepG2 cells. Lane 2, CM-stimulated HepG2 cells. Lane 3, Resting 2.2.15 cells. Lane 4, CM-stimulated 2.2.15 cells. Maximal induction of NOS2 mRNA is observed in lane 4, corresponding to CM-stimulated 2.2.15 cells. **B, middle**, shows that probing for G3PDH demonstrated relatively equal loading of RNA samples in all lanes. **B, bottom**, Relative levels for NOS2 mRNA as assessed by scanning densitometry. An approximately threefold induction of NOS2 mRNA levels is observed in CM-stimulated HepG2 cells ( $P < 0.05$  vs. resting HepG2 cells). However, induction is still higher in CM-stimulated 2.2.15 cells ( $\sim 21$ -fold induction,  $P < 0.01$  vs. resting HepG2 cells). Northern and dot blot results are representative of three separate experiments performed at different times with RNA isolated from different cell samples and each study yielded similar results. \* $P < 0.05$  vs. resting HepG2 cells. \*\* $P < 0.01$  vs. resting HepG2 cells.

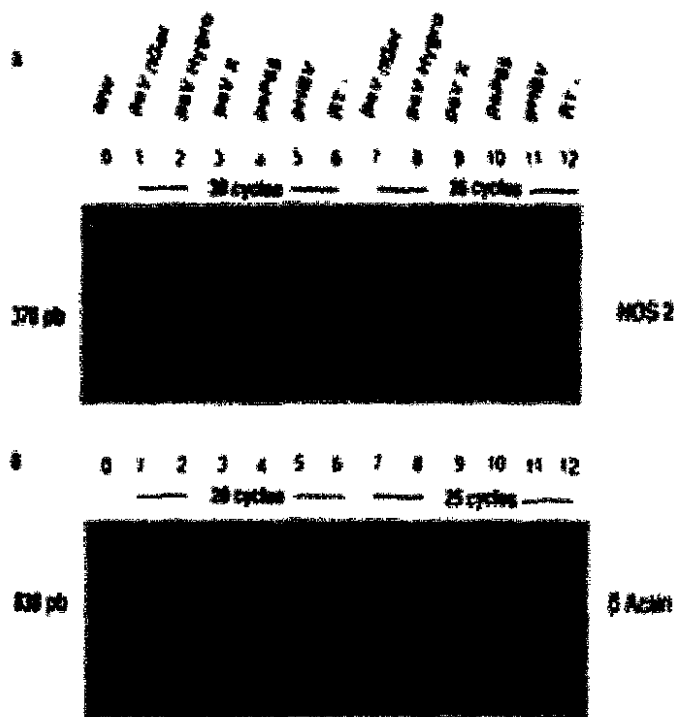


**Figure 4.** Increase in NOS2 protein expression and enzymatic activity in HepG2 and 2.2.15 hepatoma cell line supernatants after 48 h stimulation with CM. Lane C, Positive control. LPS-treated mouse macrophage lysate. Lane 1, Resting HepG2 cells. Lane 2, CM-stimulated HepG2 cells. Lane 3, Resting 2.2.15 cells. Lane 4, CM-stimulated 2.2.15 cells. NOS2 protein levels (**A**) as well as NO synthesis (**B**) were

CM stimulation of both untransfected and HBV-stably transfected HepG2 cells (2.2.15 cells) (Fig. 4). NO synthesis was greater in CM-stimulated (an approximately fivefold induction,  $P < 0.05$ ) than in resting HepG2 cells, but it was quite similar to that observed in resting 2.2.15 cells. However, the maximal NO production was found in 2.2.15 cells after 48 h of stimulation with a CM (an  $\sim 25$ -fold induction,  $P < 0.01$  vs. resting HepG2 cells) (Fig. 4 **B**). Interestingly, NOS2 enzyme activity correlated well with NOS2 protein expression, as demonstrated by immunoblot experiments performed in parallel in these same cells (Fig. 4 **A**).

Since the 2.2.15 cell line is a subclone of HepG2, the differences observed between them on NOS2 gene expression could be due to undefined clonal differences rather than to the presence of HBV. To elucidate this issue, we performed transfection experiments on distinct cell lines, HepG2, Huh7, and CCL13 cells, using a plasmid containing the whole genome of HBV, termed pHBV, as well as the plasmid pSV-X, which contains the entire open reading frame of the HBV X gene. Three irrelevant plasmids, designated psP65, psV-H, and pGCM, were used as controls. After transfection, NOS2 protein expression in resting transfected HepG2 cells was analyzed

greater in lane 2 (an approximately fivefold induction,  $P < 0.05$  vs. lane 1, but quite similar to lane 3). However, the maximal NO production ( $145.3 \pm 15.6$  nmol  $\text{NO}_2^- / 10^6$  cells) was found in CM-stimulated 2.2.15 cells (**B**, lane 4), and correlated well with NOS2 protein expression, as demonstrated by immunoblot experiments performed in parallel in these same cells (**A**). Western blot shown is representative of three separate experiments, and each study yielded similar results. Values for nitrite measurements are expressed as mean  $\pm$  SEM for three separate experiments carried out in duplicate. \* $P < 0.05$  vs. resting HepG2 cells. \*\* $P < 0.01$  vs. resting HepG2 cells.



**Figure 5.** RT-PCR for human NOS2 mRNA in transiently transfected HepG2 cells demonstrating the expected 370-bp product after 30 cycles of amplification (A). Lane 1, Representative  $\beta$ -galactosidase gene-transfected resting cells (psV  $\beta$ Gal). Lane 2, Representative hygromycin gene-transfected resting cells (psV Hygro). Lane 3, Representative HBV X gene-transfected resting cells (psV X). Lane 4, Representative psP65 plasmid-transfected resting cells. Lane 5, Representative HBV genome-transfected resting cells (pHBV). Lane 6, Negative control, as a PCR reaction without reverse transcriptase (RT<sup>-</sup>). After 35 cycles of amplification (Lanes 7-12), a stronger amplification signal was observed only in HBV X gene-transfected resting HepG2 cells (lane 9) and in HBV genome-transfected resting HepG2 cells (lane 11). In B, after 20 cycles of amplification, the 338-bp PCR product corresponding to  $\beta$ -actin showed a relatively equal amount of RNA per lane.

reverse transcription (RT) PCR. As shown in Fig. 5, the expected 370-bp product was detected in HepG2 cells transiently transfected with psV-X and pHBV (lanes 3, 5, 9, and 11), whereas the specific band was absent in cells transfected with control plasmids in both 30 and 35 cycles of amplification. As a positive control, application of RT-PCR in RNA samples from 2.215 cells demonstrated the predicted 370-bp product (data not shown). Sequencing of this PCR product confirmed its identity as NOS2. The 338-bp amplification product corresponding to  $\beta$ -actin, which was detected after 20 cycles of amplification reactions, showed a relatively equal amount of RNA per lane (Fig. 5B). Finally, and as expected, experiments performed on Hep3B and CCL13 cells yielded similar results (data not shown).

## Discussion

The most striking finding of this study was that hepatotropic viral infection plays a relevant role in the hepatocellular NOS2 upregulation, either independently or in addition to that exerted by locally released cytokines from activated immune

cells that infiltrate the liver tissue of CVH patients (32, 33). In this sense, our data herein clearly demonstrate that although HBV itself was able to induce the NOS2 gene expression, this effect was enhanced markedly by proinflammatory cytokines. This apparent cytokine-mediated synergistic effect on hepatocellular NOS2 gene expression *in vitro* could also be operative *in vivo* since an enhanced intrahepatic expression of some cytokines, such as TNF- $\alpha$  (20) and IFN- $\gamma$  (21), in CVH has been demonstrated recently. In our experiments on cultured hepatoma cells stimulated with a CM, when NOS2 mRNA levels were quantitated by radioanalytic scanning, CM-stimulated untransfected HepG2 cells and resting HBV-transfected HepG2 cells accounted for a small percentage of maximal NOS2 mRNA expression shown by CM-stimulated HBV-transfected HepG2 cells. These data suggest that proinflammatory cytokines and HBV are truly synergistic for NOS2 expression, because the magnitude of the NOS2 mRNA levels found in CM-stimulated HBV-transfected cells was greater than the sum of the separate conditions. Nevertheless, the precise molecular basis for this synergy remains to be defined.

Although distinct viruses such as EBV (34), HIV-1 (35), and Coxsackie virus B3 (36) have been demonstrated to be able to induce NOS2 expression, to our knowledge, in this work we provide the first evidence that the X gene product of HBV alone can upregulate the NOS2 gene expression in cultured human hepatocyte-derived cells. Furthermore, the presence of an enhanced NOS2 expression in hepatocytes from patients with CAHB, without relationship to the degree of hepatic inflammation, strongly supports the assumption that a similar HBx-mediated effect on NOS2 gene expression could be fully operative in human hepatocytes during *in vivo*-acquired HBV infection. According to our immunohistochemical and *in situ* hybridization findings from patients with CAHC, a similar situation in HCV-infected hepatocytes may occur. Supporting this latter assumption, recent data from Mihm et al. (37) demonstrated that NOS2 transcript expression was increased in the liver tissue of chronically HCV-infected patients, and that it was found to be positively correlated with hepatic HCV RNA content in these patients. All these findings suggest that intrahepatic viral load appears to be a key point influencing the hepatocellular NOS2 expression during both chronic HBV and HCV infections.

De Vera et al. (38) demonstrated that the human NOS2 gene is regulated transcriptionally by proinflammatory cytokines through responsive elements located upstream of the proximal 5' flanking region. However, they showed that the proximal 5' flanking region of human NOS2 gene contains multiple putative cytokine-responsive elements, such as nuclear factor  $\kappa$ B and IFN- $\gamma$ -responsive elements. It is well known that HBV is able to induce the expression of viral and cellular genes (39, 40), and that this effect is mediated, at least in part, by HBx, which transactivates gene promoters containing multiple sequence motifs, including nuclear factor  $\kappa$ B binding sites (41, 42). The presence of a number of these *cis*-acting elements within the human NOS2 gene promoter makes it conceivable that hepatocellular NOS2 gene expression may also be transcriptionally upregulated by HBx. However, NOS2 expression is known to be regulated on several levels, including mRNA stability, protein degradation, and enzyme activity (43). Although we have obtained evidence that the NOS2 gene promoter activity is induced markedly in transiently HBV X gene-transfected cells, supporting a virus-induced NOS2 gene

upregulation at the transcriptional level (our unpublished data), the mild discrepancy between NOS2 mRNA and protein levels observed in cytokine-stimulated HepG2 cells suggests that a posttranscriptional regulation may also exist. Nevertheless, further studies are needed to clarify more accurately the mechanisms by which HBV induces NOS2 gene expression in human hepatocytes. These studies are currently ongoing in our laboratory.

NO is an important effector molecule involved in a wide variety of physiological processes, such as neurotransmission, vasodilation, and cytotoxicity (44). Recent studies have shown that NO is also implicated in other activities, such as growth inhibition of DNA viruses (45, 46), as a second messenger mediating endothelial cell growth (47), and as a potent radical molecule contributing to DNA damage and carcinogenesis (48, 49). Based on our findings from patients with CVH, the increased hepatocellular NOS2 expression could be part of a nonspecific host response to viral infection inhibiting its replication. This antiviral effect of NO would explain, at least in part, the increase in viral titers observed when corticosteroids, which are NOS2 inhibitors (50), are used in patients with CVH (51).

It has been described that NO promotes angiogenesis *in vivo* (52), and we have demonstrated recently the existence of an active process of angiogenesis in portal tracts from patients with CVH (19). The present data lead us to hypothesize that a link may exist between enhanced hepatocellular NO production and portal angiogenesis, but the possible role played by NO mediating intrahepatic angiogenesis remains to be elucidated.

A major epidemiological association between either chronic HBV or HCV infections and hepatocellular carcinoma (HCC) is evident (53, 54). However, the underlying mechanisms that lead to the development of HCC are still not entirely understood. Although integration of HBV DNA sequences into the liver cell genome could activate cellular protooncogenes, it is very infrequent and hence does not explain the majority of HBV-induced HCCs (55). It is well known that high levels of NO can cause deamination of DNA bases, leading to DNA damage as well as mutation in human cells (48, 49), and it has been demonstrated more recently that NO is able to induce functional modifications of p53 tumor-suppressor protein (56), increasing the risk of malignant cell transformation. The first experimental evidence of a link between hepadnavirus infection and NO production came from several reports of Liu et al. (57, 58), who showed that woodchucks chronically infected with woodchuck hepatitis virus, which is a member of the hepadnavirus family to which HBV belongs, exhibited a significant increase in NO production *in vivo* and endogenous formation of *N*-nitroso carcinogenic compounds. More recently, the same authors demonstrated that woodchuck HBsAg alone was sufficient to induce high levels of NO synthesis in cultured hepatocytes (59). In humans, an alternative explanation may be that the unregulated expression of HBx contributes to the malignant transformation of the infected hepatocytes, either through its transcriptional transactivating properties (60, 61) or by inactivating the p53 tumor-suppressor gene product (62, 63). Interestingly, overexpression of NOS2 induces the hepatocellular accumulation of p53 and subsequent downregulation of NO synthesis through p53-mediated inhibition of NOS2 promoter (64). Therefore, a possible pathogenic mechanism of liver cancer might be that the

disruption of p53 activity either by mutations, as observed frequently in HCC (65), or by interactions with viral proteins, such as HBx (66), would produce a loss in p53-mediated regulation of NOS2 activity. In addition, the HBx-mediated upregulation of human hepatocyte NOS2 gene could generate a long-term overproduction of NO in liver cells, resulting in an increase in NO-related DNA damage leading to the development of neoplastic cell growth, thus providing a mechanism by which chronic HBV infection increases the risk of liver cancer.

In conclusion, we have demonstrated that hepatotropic viral infections induce NOS2 gene upregulation in human hepatocytes, suggesting that the increased intrahepatic NO production could play an important functional role influencing the natural history of virus-induced chronic hepatitis. Additionally, although the intrahepatic expression level of NOS2 was significantly lower in both alcoholic liver disease and nonimmune-mediated cholestasis than in CVH, further studies are warranted to test whether this low level of hepatocellular NOS2 expression could have significance for the pathobiology of these processes.

## Acknowledgments

The liver pathological analysis of Dr. Asunción García-Sánchez is gratefully acknowledged. We wish to thank Dr. Massimo Levrero and Dr. Francisco Sánchez-Madrid for critical readings of the manuscript and for helpful suggestions. We are also indebted to Brenda Astley for her English language assistance, and Rocha Barroso for preparing the manuscript.

This work has been supported by grants to R. Moreno-Otero (Fondo de Investigación Sanitaria [FIS] 95/0264) and to M. López-Cabrera (FIS 95/0268) from Instituto Nacional de la Salud.

## References

1. Moncada, S., R.M.J. Palmer, and E.A. Higgs. 1989. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.* 38:1709-1715.
2. Moncada, S., R.M.J. Palmer, and E.A. Higgs. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43:109-142.
3. Nathan, C., and G.W. Xie. 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78:915-918.
4. Bredt, D.S., and S.H. Snyder. 1991. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:682-685.
5. Janssens, S.P., A. Shimouchi, T. Quertermous, D.B. Bloch, and K.D. Bloch. 1992. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 267:14519-14522 (erratum, 267:22964).
6. Xie, Q.W., H.J. Cho, J. Calaycay, R.A. Mumford, K.M. Swiderek, T.D. Lee, A. Ding, T. Yocco, and C. Nathan. 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide from mouse macrophages. *Science* 256:225-228.
7. Geller, D.A., C.J. Lowenstein, R.A. Shapito, A.K. Nussler, M. Di Silvio, S.C. Wang, B.K. Nakayama, R.L. Simmons, S.H. Snyder, and T.R. Billiar. 1993. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3491-3495.
8. Nussler, A.K., M. Di Silvio, T.R. Billiar, R.A. Hoffman, D.A. Geller, R. Selby, J. Madariaga, and R.L. Simmons. 1992. Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J. Exp. Med.* 176:261-264.
9. Geller, D.A., A.K. Nussler, M. Di Silvio, C.J. Lowenstein, R.A. Shapito, S.C. Wang, R.L. Simmons, and T.R. Billiar. 1993. Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:522-526.
10. Moncada, S. 1992. The 1991 Ulm von Euler Lecture. The L-arginine/nitric oxide pathway. *Acta Physiol. Scand.* 145:201-227.
11. MacMicking, J.D., D.O. Willenborg, M.J. Weidemann, K.A. Rockett, and W.B. Cowden. 1992. Elevated secretion of reactive nitrogen and oxygen intermediates by inflammatory leukocytes in hyperacute experimental autoimmune encephalomyelitis: enhancement by the soluble products of encephalitogenic T cells. *J. Exp. Med.* 176:303-307.
12. Weinberg, J.B., D.L. Granger, D.S. Pisetsky, M.F. Seldin, M.A. Mouton, S.H. Mason, A.M. Fippen, F. Ruiz, E.R. Wood, and G.S. Gilkeson. 1994.





Fennell 1998. Woodchuck hepatitis virus surface antigen induces nitric oxide synthase in hepatocytes: possible role in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 19:2875-2877.

60. Aubero, B., and R.J. Schneider. 1990. The hepatitis B virus X gene product transactivates both RNA polymerases II and III promoters. *EMBO J. Eur. Mol. Biol. Organ. J.* 9:497-504.

61. Benedict Yen, T.S. 1996. Hepatitis viral X protein: review of recent progress. *J. Biomed. Sci.* 1:20-30.

62. Wang, X.W., M.K. Gibson, W. Vermeulen, H. Yeh, K. Forrester, H. W. Strassburger, J.H.J. Hoejmakers, and C.C. Harris. 1995. Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer Res.* 55:4012-4016.

63. Ueda, H., S.J. Ullrich, J.D. Gangemi, C.A. Kappel, L. Ngo, M.A. Ferlicson, and G. Jay. 1995. Functional inactivation but not structural mutation of p53

causes liver cancer. *Nat. Gen.* 9:41-47.

64. Forrester, K., S. Ambs, S.L. Lupold, R.B. Kaput, J.A. Spillare, W. Weinberg, E. Jeffrey Rosen, X.W. Wang, D.A. Geller, E. Zeng, et al. 1996. Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:2442-2446.

65. Greenblatt, M.S., W.P. Bennett, M. Hollstein, and C.C. Harris. 1999. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and its molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 59:4855-4878.

66. Tsoum, R., I. Altshuler, I. Greenblatt, C. Prives, and J.A. Grumley. 1995. Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition by HBx of p53 response element-directed transactivation. *J. Virol.* 69:1851-1859.

## Intrahepatic accumulation of nitrotyrosine in chronic viral hepatitis is associated with histological severity of liver disease

Carmelo Garcia-Monzón<sup>1</sup>, Pedro L. Majano, Itxaso Zubia, Paloma Sanz, Arantxa Apolinario and Ricardo Moreno-Otero

<sup>1</sup>Hepatology Unit, Hospital Universitario Santa Cristina, and Liver Unit, Hospital Universitario de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

**Background/Aims:** The toxicity of nitric oxide is thought to be engendered, at least in part, by its reaction with superoxide yielding peroxynitrite, a potent oxidant that promotes the formation of nitrotyrosine within cells and tissue lesions. In this study we assessed the intrahepatic localization and distribution of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) and nitrotyrosine (NTY) in patients with viral and non-viral liver disease.

**Methods:** We carried out single and double immunostaining experiments on cryostat liver biopsy sections using monoclonal antibodies against iNOS and NTY. We also performed a comparative analysis between the intrahepatic immunostaining score of NTY and the histological activity index of chronic viral hepatitis.

**Results:** We found a marked hepatocellular expression of iNOS with a diffuse lobular pattern in all liver samples from patients with viral liver disease, whereas NTY localization was mainly restricted to cellular

foci consisting of hepatocytes and Kupffer cells. Interestingly, we demonstrated by means of double immunostaining experiments the existence of hepatocellular co-localization of iNOS and NTY in the majority of NTY-expressing liver cells. The amount of NTY was significantly higher in liver biopsies from viral liver disease than in non-viral liver disease. In addition, a statistically significant association between the intrahepatic amount of NTY and the severity of viral liver disease was found.

**Conclusions:** Nitric oxide-mediated nitration of hepatocellular proteins is markedly induced in the inflamed liver tissue from patients with chronic viral hepatitis, and appears to be associated with the histological severity of viral chronic liver disease.

**Key words:** Chronic viral hepatitis; Inducible nitric oxide synthase; Nitric oxide; Nitrotyrosine; Peroxynitrite.

A MAJOR EPIDEMIOLOGICAL and clinical association between either hepatitis B virus (HBV) or hepatitis C virus (HCV) infections and the development of chronic hepatitis and the appearance of hepatocellular carcinoma is currently evident (1–4). A large body of experimental evidence indicates that both host-related factors (as demonstrated by the presence of intrahepatic virus-specific activated cytotoxic T cells (5–7)), and virus-related factors (different authors have reported that inflammation was more severe in liver tissue where more viral antigens were present (8–11)), play a role in

the progression of liver damage in chronic HBV and HCV infections. We have recently demonstrated that the expression of iNOS was markedly enhanced by either HBV or HCV infection in hepatocytes from patients with chronic hepatitis, suggesting that a long-term overproduction of iNOS-generated NO may mediate important pathogenic events in the course of chronic viral hepatitis (CVH) (12). Further supporting this assumption, Mihm et al. have found that the hepatic expression of iNOS in chronic hepatitis C was positively related to the hepatic viral load and liver injury (13).

During inflammation, one of the mechanisms for NO-induced cytotoxicity is explained, at least in part, by its reaction with superoxide (SOX) to form peroxynitrite (PYT) (14). This potent oxidant agent promotes nitration on the ortho position of aromatic amino

Received 5 March, revised 18 June, accepted 29 July 1999

Correspondence: Carmelo Garcia-Monzón, Hepatology Unit, Hospital Universitario Santa Cristina, C/O'Donnell, 59, 28009-Madrid, Spain. Tel: 341 309 3911.

Fax: 341 409 6185. e-mail: garciamonzon@teleline.es

acids, yielding nitrotyrosine (NTY) as a stable end product after their interaction with cellular proteins (15). Thus, evidence of *in vivo* generation and biological activity of peroxynitrite can be shown by the presence of NTY within cells from injured tissues (16,17). In other words, the detection of NTY would serve as an indicator of reactive nitrogen intermediates generated from NO.

Evidence for *in vivo* PYT production has been recently obtained by detecting NTY in biological samples from patients with distinct chronic inflammatory disorders (18,19). By contrast, few data concerning the intrahepatic generation of NO-derived oxidants in chronic liver disease are available so far (20), with information lacking about its relationship with the presence of active viral infection and with the intrahepatic expression pattern of viral antigens. In this study we address these two questions: 1) assessing by immunohistochemistry the expression and cellular distribution of iNOS and NTY in liver biopsy samples from patients with viral liver disease and non-viral liver disease, and 2) determining whether the intrahepatic NTY localization may be related to the histological severity of viral liver disease.

## Materials and Methods

### Characteristics of patients

The study included 54 patients with liver biopsy findings compatible, according to the classification proposed by Scheuer (21), with chronic hepatitis (CH). All these patients attended the Liver Unit of the Hospital de la Princesa in Madrid, where they were referred because of persistently elevated serum alanine transaminase (ALT) levels. Patients with chronic hepatitis type B (CHB) were consecutively included in this study, but patients with chronic hepatitis C (CHC) had been carefully selected for a previous study (22), and all of them had a post-transfusion risk factor. A detailed description of the demographics, and biochemical and virological features of all patients with chronic viral hepatitis included is shown in Table 1.

Summarizing, CHB was diagnosed in 22 patients (15 males and 7 females, mean age: 31 years), and CHC in 32 (19 males and 13 fe-

males, mean age: 40 years). The diagnostic criteria for viral hepatitis included either the positivity of both hepatitis B surface antigen (HBsAg) and HBV DNA in the serum of patients with CHB, or the presence of antibodies to both HCV (anti-HCV) and HCV RNA in the serum of patients with CHC, more than 6 months before undergoing liver biopsy.

Liver tissues from eight patients with alcoholic steatosis, ten patients with histological changes of cholestasis (mild portal inflammation and/or ductular hyperplasia) and seven patients with histologically normal liver were also studied as controls for immunohistochemical analysis. Patients with alcoholism included in this study consumed more than 80 g per day for more than 10 years, and a percutaneous liver biopsy was performed on each one for diagnostic purposes. Liver biopsy samples with histopathological features of cholestasis or with minimal reactive changes (normal liver) were obtained during abdominal surgery for noncomplicated cholelithiasis.

All of these control patients were negative for HBsAg and anti-HCV, and both CVH and control patients lacked antibodies to HIV (anti-HIV).

This study protocol was approved by the Institution's human research committee.

### Viral markers

HBsAg, HBeAg, anti-HBe, and anti-HIV were determined by commercially available enzyme immunoassay kits (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA). HBV DNA was tested by a commercial immunoassay kit (Hybrid Capture System, Murex Diagnosticon S.A., Madrid, Spain). Anti-HCV was detected using a commercially available second-generation enzyme-linked immunoassay kit (Ortho Diagnostic Systems, Inc., Raritan, NJ, USA). HCV RNA was detected by a nested PCR technique using primers from the highly conserved 5' noncoding region of the HCV genome, as described elsewhere (22). Intrahepatic expression of HBeAg was tested on frozen liver biopsy sections (as first antibody in double-immunostaining experiments) using a commercially available prediluted and peroxidase-conjugated rabbit antiserum anti-HBeAg (Dakopatts, Copenhagen, Denmark).

### Monoclonal antibodies

An IgG2a monoclonal antibody (mAb), that recognizes a 21-kD protein fragment corresponding to amino acids 961-1144 of mouse macrophage iNOS (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA), and a mouse IgG mAb anti-nitrotyrosine (Upstate Biotechnology Inc., Saratoga Lake, NY, USA) were used at a working concentration of 1 µg/ml. Regarding the specificity of the anti-mouse macrophage iNOS mAb used in this study, we have previously shown (12) that, in immunostaining experiments on cryostat human liver sections, this mAb fully cross-reacted with the human hepatocyte iNOS, whereas no cross-reactivity with the human constitutive isoforms of NOS (either neuronal or endothelial) was observed. For the detection of Kupffer cells in double-staining experiments, we used the HC1/1 anti-CD11c mAb that specifically recognizes human macrophages (23). The P3X63 mouse myeloma supernatant was used as negative control in all immunostaining experiments.

### Liver tissue studies

Liver biopsy samples from CVH and alcoholic patients were obtained for diagnostic purposes, after informed written consent, using a Menghini needle by a percutaneous route. Liver samples from patients with non-viral liver disease (cholestasis) or with histologically normal liver were obtained, after informed written consent, during abdominal surgery for noncomplicated cholecystectomy. All liver biopsy specimens were divided into two parts. The first was fixed in 10% formaldehyde and embedded in paraffin for routine histological examination, and the second part was snap-frozen in nitrogen-cooled isopentane and stored at -80°C until used for immunohistochemistry.

**Liver histology:** Biopsy specimens from all patients were evaluated by the same pathologist, establishing the histological diagnosis of CH, and both the grade of inflammation and the stage of fibrosis were scored (0 to 4), using the classification of CVH proposed by Scheuer (21). In addition, we classified histological liver disease as

TABLE 1  
Demographics, biochemical, and virological features of patients with chronic viral hepatitis

	HBV (22)	HCV (32)
Age (mean ± S.D., years)	31 ± 7	40 ± 9
Sex (male/female)	15 M/7 F	20 M/12 F
ALT (mean ± S.D., U/l)	205 ± 158	183 ± 151
HBeAg/HBeAb (n/n)	7/15	ND
HBV DNA (mean ± S.D., pg/ml)	157 ± 132	ND
HCV genotype	ND	
1b		23 (72%)
non-1b		9 (28%)
HCV viremia (mean ± S.D., virus/ml)	ND	558,875 ± 512,132

HBV: Hepatitis B virus; HCV: Hepatitis C virus; ALT: Alanine transaminase; HBeAg: Hepatitis B e antigen; HBeAb: Hepatitis B e antibody; ND: Not done.

and of severe based on the overall histological score, defining mild liver disease as equal to or lower than 4, and severe liver disease as higher than 4. According to this scoring system, typical histology for mild liver disease was portal inflammation with minimal or no piecemeal necrosis, with fibrosis restricted to portal tracts, whereas histological lesions featuring severe liver disease were periportal and sinusoidal inflammation with bridging fibrosis.

**Immunohistochemical staining of liver biopsy sections: Immunoperoxidase staining.** Rehydrated acetone-fixed 5-µm cryostat sections were first incubated with normal rabbit serum (Dakopatts, Copenhagen, Denmark) to saturate Fc receptors. Liver sections were then incubated with monoclonal antibody culture supernatants for 40 min at room temperature in humid chambers. Subsequently, sections were incubated with peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin G (Dakopatts). Each incubation was followed by three washes in Tris-buffered saline (TBS) isotonic buffer (pH 7.6). Sections were developed with the Graham Karnovsky solution containing 0.5 mg/ml of 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and hydrogen peroxide. This reaction was stopped by washing with TBS buffer. Sections were counterstained with Carazzi's hematoxylin, dehydrated, and mounted using routine methods.

**Double immunocytochemical staining.** For double immunostaining, the sequential method proposed by Mason et al. was used (24). Briefly, after the development of the DAB reaction obtained after incubation with the peroxidase-conjugated antiserum anti-HBcAg, the sections were saturated again with normal rabbit serum (Dakopatts) and then incubated with the second mAb (anti-nitrotyrosine). Subsequently, sections were incubated with a rabbit anti-mouse IgG (Dakopatts), followed by a third incubation with the alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase mouse monoclonal complex (Dakopatts). Each incubation was followed by three washes in TBS. Finally, the alkaline phosphatase reaction was developed by incubating the sections with a Tris-HCl (50 mmol/l, pH 8.2) buffer solution containing 0.2 mg/ml naphthol AS-MX phosphate (Sigma Chemical Co.) and 1 mg/ml Fast blue salt (Sigma Chemical Co.) with 10<sup>-3</sup> mmol/l Levamisole as an inhibitor of endogenous alkaline phosphatase activity. The reaction product was a bright-blue precipitate that contrasted with the brown color of the DAB reaction. Sections were mounted in buffered gelatin for microscopic examination.

**Evaluation of immunoperoxidase-stained liver biopsy sections.** Each section was semi-quantitatively evaluated by two independent observers using a Nikon light microscope (Nikon Labophot, Tokyo, Japan) without knowledge of either the clinical or the histological diagnosis. Both observers agreed that any brown-stained cell, either hepatocyte or sinusoidal-lining cell (SLC), was considered a single, positive cell. In order to establish a more accurate comparative data analysis, and given that we had the previous knowledge that hepatocytes expressing iNOS were diffusely distributed throughout the hepatic lobules, cell counting was performed in three different and randomly-chosen lobular areas at high power (×250). Four distinct items were recorded on separate sheets as follows: 0, no staining; 1, positive staining in less than 10% of cells per high power field; 2, positive staining in more than 10% but less than 50% of cells per high power field; and 3, positive staining of more than 50% of cells per high power field. Finally, data were averaged to mean values, configuring a numerical score for each liver biopsy specimen, and used for statistical analysis.

**Evaluation of double-immunostained liver biopsy sections.** Sections were evaluated by two observers as described above. Both observers agreed that any brown-stained cell represented either an iNOS-expressing cell (double staining iNOS/NTY), a Kupffer cell (double staining CD11c/NTY) or an HBcAg-expressing cell (double staining HBcAg/NTY), and that any blue-stained cell was considered a NTY-bearing cell in all double-staining experiments. In these experiments, double-stained cells displayed a characteristic grayish color.

**Statistical analysis**

To determine the statistical significance of variations in staining intensity, we first calculated the mean values of scores from each liver bi-

opsy group, these values were then compared by the Mann-Whitney U-test for non-parametric data.

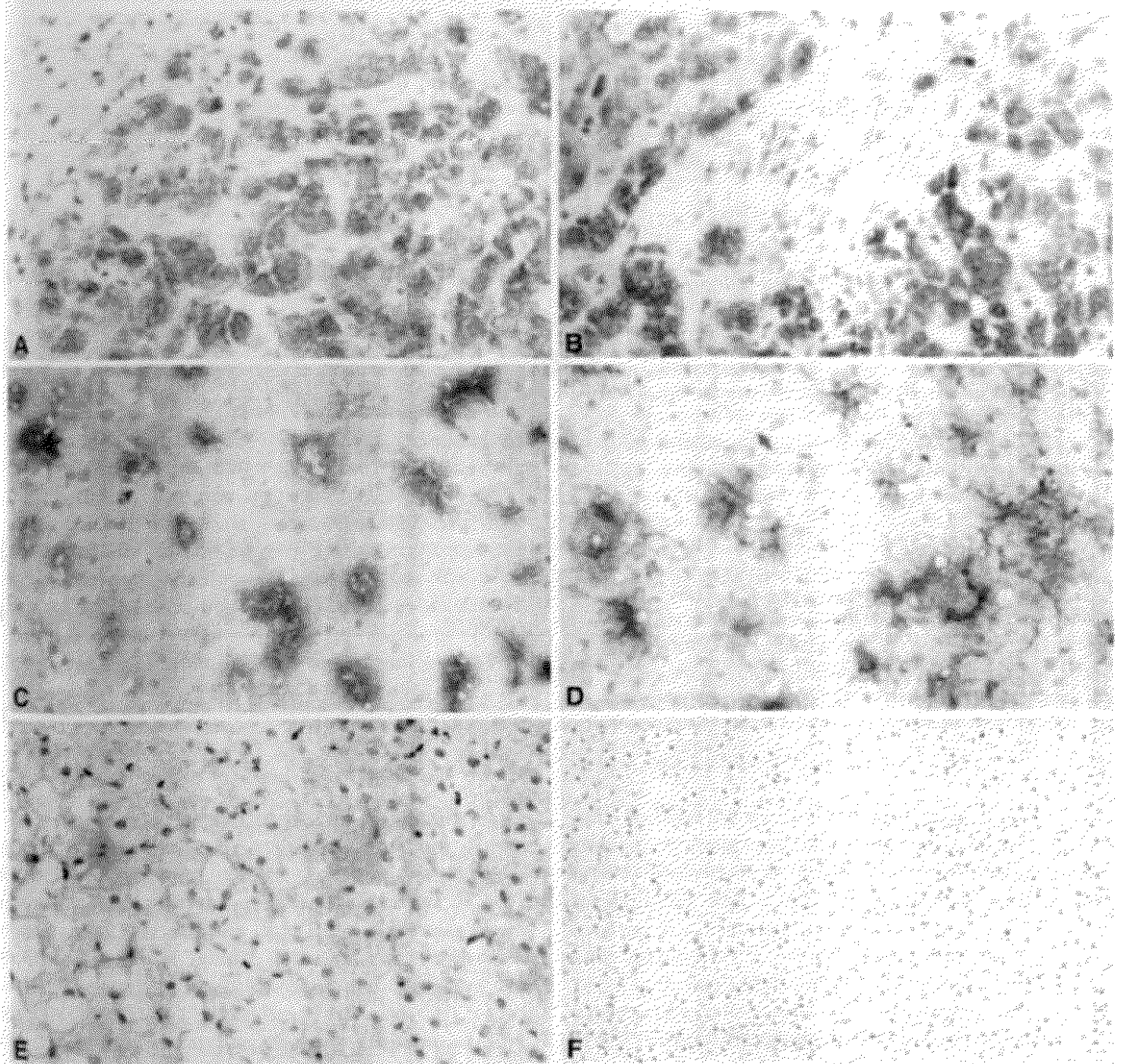
**Results**

Since there is a close relationship between viral infection and hepatocellular iNOS expression (12), we first examined whether the intrahepatic expression of NTY - a specific "footprint" of nitric oxide-derived oxidative damage - could be related to the presence of active viral infection, and second whether the amount of hepatic NTY might be related to the histological activity index of CVH.

*Intrahepatic expression pattern of iNOS and NTY in viral and non-viral liver disease*

An intense expression of iNOS was found in all liver tissue samples from patients with either CHB or CHC. Positive iNOS staining was observed mainly in the cytoplasm of the hepatocytes, with a diffuse distribution pattern throughout the hepatic lobules. It was noticeable that the intrahepatic expression pattern of iNOS was similar in both types of CVH (Fig. 1A and 1B). When the liver tissues from CVH included in this study were stained for NTY, all these samples showed NTY-positive cellular clusters (formed by hepatocytes and sinusoidal-lining cells) distributed throughout the hepatic lobules but with a focal pattern and, it is noteworthy that there was no clear relationship with either lobular or periportal areas of inflammation and necrosis. Interestingly, NTY immunoreactivity was similar in both types of CVH (Fig. 1C and 1D). Furthermore, NTY and iNOS did not consistently label mononuclear cells infiltrating portal tracts in CVH, but a marked NTY immunoreactivity along the vascular endothelium was seen in some liver tissue samples with CVH. Hepatocellular NTY expression was concentrated mainly at the submembranous cellular level, whereas iNOS labeling was distributed more diffusely in the cytoplasm. Serial liver biopsy sections from CVH confirmed that all NTY-labeling hepatocytes co-expressed iNOS, but many liver cells showing a positive iNOS staining were negative for NTY. In contrast, when we carried out immunostaining experiments in liver tissue from patients with non-viral liver disease (alcoholic steatosis and cholestasis), a low level of both iNOS and NTY immunoreactivity was observed in some hepatocytes and in scattered cellular foci (Fig. 1E), respectively. In addition, in all cases of histologically normal liver tissue studied no labeling of iNOS and NTY (Fig. 1F) was detected.

In order to define more accurately the potential association of both iNOS and NTY at the unicellular level, we carried out double immunostaining experi-



*Fig. 1. Intrahepatic expression pattern of iNOS and NTY in patients with viral and non-viral liver disease, as observed by immunostaining experiments. Positive iNOS staining (brown-colored cells) was observed in the cytoplasm of the hepatocytes with a diffuse distribution pattern throughout the hepatic lobules, being similar in CHB (Panel A, original magnification  $\times 450$ ) and in CHC (Panel B, original magnification  $\times 450$ ). In contrast, NTY immunoreactivity was restricted to positive cellular clusters, formed by hepatocytes and sinusoidal-lining cells, with a focal distribution pattern, being similar in CHB (Panel C, original magnification  $\times 450$ ) and in CHC (Panel D, original magnification  $\times 450$ ). In the liver tissue from patients with non-viral liver disease, a low level of NTY staining was observed in some hepatocytes and in scattered cellular foci in the liver tissue from patients with alcoholic steatosis (Panel E, original magnification  $\times 450$ ). Furthermore, in all cases of histologically normal liver tissue studied no labeling of NTY was detected (Panel F, original magnification  $\times 250$ ).*

ments, on different liver biopsy sections from patients with CVH, which clearly demonstrated the existence of a co-localization of iNOS and NTY in a significant proportion of NTY-stained hepatocytes (Fig. 2A).

Moreover, we showed that the majority of sinusoidal CD11c<sup>+</sup> macrophages (Kupffer cells) were stained with the anti-NTY monoclonal antibody (double-stained cells display a grayish color) (Fig. 2B).

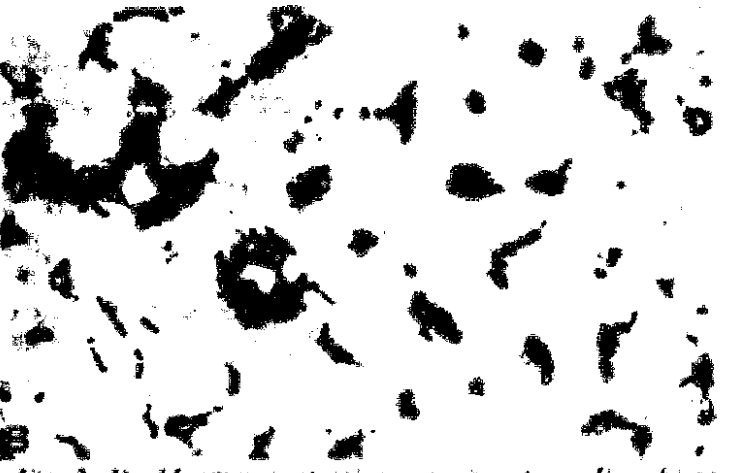


Fig. 2 Double-immunostaining experiments on liver biopsy sections from patients with CVH demonstrated the existence of a hepatocellular co-localization of iNOS (brown-colored) and NTY (blue-colored) in a significant proportion of hepatocytes (double-stained liver cells display a grayish color) (Panel A, original magnification  $\times 450$ ) as well as the fact that the majority of sinusoidal CD11c+ macrophages (brown-colored) were stained with the anti-NTY monoclonal antibody (double-stained cells display a grayish color) (Panel B, original magnification  $\times 450$ ). It is noticeable that in all cases of CHB studied NTY-labeled cellular foci (blue-colored) were located in close relation with HBeAg-expressing hepatocytes (brown-colored cells with a nuclear pattern) (Panel C, original magnification  $\times 450$ ).

In addition, we wanted to explore whether differences in the intrahepatic accumulation of both iNOS and NTY among viral and non-viral liver disease were significant, using a semi-quantitative analysis of immunostained liver samples from these patients, whose results are shown in Table 2. To summarize, no significant difference in the intrahepatic staining score of both iNOS and NTY between CHB and CHC was found, but this difference reached statistical significance compared with that obtained in liver tissue from patients with non-viral liver disease. In order to sup-

port further the assumption that cellular NTY accumulation could be closely related to active viral replication, we carried out double-immunostaining experiments, using first a polyclonal antibody against the hepatitis B core antigen and second a monoclonal antibody against NTY, on liver tissue samples from patients with CHB included in this study. Thus, it was interesting to note that in all cases studied the majority of NTY-expressing cellular foci, which were distributed throughout the hepatic lobules, were located in close relation with HBeAg-expressing hepatocytes (Fig. 2C).

TABLE 2

Comparative immunohistochemical scoring of iNOS and NTY expression in viral and non-viral liver disease

Diagnosis	No. of patients	iNOS score	NTY score
CHB	n=22	2.7 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.6
CHC	n=22	2.5 $\pm$ 0.6	1.5 $\pm$ 0.5
CHL	n=10	1.2 $\pm$ 0.6*	0.9 $\pm$ 0.7*
AS	n=8	1.1 $\pm$ 0.5*	0
NL	n=7	0	0

\*P < 0.05 versus both CHB and CHC.

iNOS: Inducible nitric oxide synthase; NTY: Nitrotyrosine; CHB: Chronic hepatitis B; CHC: Chronic hepatitis C; CHL: Cholestasis; AS: Alcoholic steatosis; NL: Normal liver.

*Intrahepatic NTY accumulation and severity of viral liver disease*

In order to define a possible relationship between the intrahepatic NTY staining intensity and the histological severity of CVH, we first classified liver samples from these patients into two groups as follows: mild liver disease (MLD), previously defined as an overall histological score equal to or lower than 4, and severe liver disease (SLD), when the score was higher than 4. Thus, 10 liver biopsies with CHB and 18 with CHC had MLD, whereas the group with SLD consisted of 12 liver biopsies with CHB and 14 with CHC. We then performed a comparative statistical analysis of the in-

TABLE 3

Relationship between the intrahepatic NTY score and the severity of CVH

CHB		CHC				
MLD	SLD	MLD	SLD			
(n=10)	(n=12)	(n=18)	(n=14)			
NTY score	11±0.5	2.5±0.7	p<0.001	0.9±0.5	2.1±0.5	p<0.001

NTY: Nitrotyrosine. CVH: Chronic viral hepatitis. CHB: Chronic hepatitis B. CHC: Chronic hepatitis C. MLD: Mild liver disease. SLD: Severe liver disease.

trahepatic NTY staining score found in the two mentioned histological CVH groups, whose data are shown in Table 3. In summary, the intrahepatic NTY score was significantly higher in those cases of CVH, either type B or type C, with SLD than in cases of CVH with MLD, showing an evident relationship between the intrahepatic amount of NTY and the severity of liver disease.

### Discussion

In the present study we have shown that the intrahepatic amount of NTY is significantly higher in viral liver disease than in non-viral liver disease (see Table 2). Furthermore, although NTY has been recently described in liver tissue from patients with CVH (20), in the present study we demonstrate for the first time that the intrahepatic accumulation of NTY – a marker of PYT attack on cellular proteins – is positively related to the severity of liver damage in CVH (see Table 3), suggesting that PYT may play a significant role in the pathogenesis of liver disease. Given that PYT results from the reaction of NO and the superoxide anion (SOX) (14), it is conceivable that in the intrahepatic microenvironment of CVH an important source of both NO and SOX exists, explaining the formation of significant amounts of PYT during CVH.

On one hand, since a marked induction of iNOS expression is observed in the majority of hepatocytes from patients with CVH, it is likely that these liver cells are a powerful cellular source of large quantities of NO. Supporting this assumption, in a previous study on human hepatocyte cell lines we demonstrated that the increased iNOS protein expression found in hepatitis B virus-transfected cells was positively correlated to cellular NO release, detecting higher nitrite levels in transfected than in untransfected cells (12). Therefore, we believe that the enhanced hepatocellular iNOS expression seen in viral liver disease could be fully operative *in vivo*, producing high levels of NO. Further reinforcing the enhancer role of hepatitis B virus on the hepatocellular NO production is our finding that the

cellular foci of NTY accumulation in the liver tissue from patients with CHB were mainly located in those areas where HBcAg-expressing hepatocytes were predominant.

On the other hand, although we did not identify the exact origin of SOX that may react with NO to form PYT, several cellular sources could be considered. Activated macrophages and other primed inflammatory cells are able to release highly reactive oxygen species, such as SOX, during tissue inflammation (25,26). The intrahepatic localization of NTY, mainly in cellular clusters consisting of both hepatocytes and sinusoidal CD11c+ macrophages (Kupffer cells), strongly suggest that tyrosine nitration is the result of PYT generation due to the reaction of SOX released by activated inflammatory cells (e.g. Kupffer cells) located in the vicinity of NO-producing cells (e.g. hepatocytes and Kupffer cells). Interestingly, even human hepatocytes are able to generate intracellular SOX after incubation with an NO donor molecule termed SNAP (27), suggesting that the hepatocellular PYT formation and, as a consequence, the intracellular NTY accumulation that we observed in CVH could both be due to the generation of NO and SOX by the same virus-infected hepatocytes. The evidence provided in this paper that in the liver tissue from patients with CVH the majority of sinusoidal CD11c+ macrophages (Kupffer cells) were stained with the anti-NTY monoclonal antibody, clearly suggests that Kupffer cells could be a significant source of PYT as well. Finally, it is interesting to note that the discrepancy observed between hepatocellular iNOS expression (cytoplasmic with a diffuse distribution pattern) and hepatocellular NTY accumulation (submembranous with a focal distribution pattern) in the liver tissue from patients with CVH could be due to the intracellular NTY accumulation being a long-term process that requires both a continuous and a simultaneous source of NO and SOX either by the same cell or by closely related foci of cells (e.g. hepatocyte and Kupffer cell), whereas iNOS expression could be markedly induced in the majority of hepatocytes by the action of viral proteins and proinflammatory cytokines produced in the inflamed liver tissue during CVH.

The pathogenic role that NO-mediated nitration of hepatocellular proteins plays in CVH appears to be evident, as the results of the present study clearly indicate that the abnormal intrahepatic accumulation of NTY observed in patients with chronic viral liver disease was significantly higher in those cases with severe liver disease than in cases with mild liver disease. Further evidence that tyrosine nitration may contribute to liver injury is the fact that in liver tissue from



patients with non-viral liver disease studied (most with histological features of alcoholic steatosis and cholestasis with minimal inflammation), and also in histologically normal liver, the NTY reactivity was respectively very weak or absent. Nevertheless, although an increased localization of NTY has been observed in the injured tissues of distinct chronic inflammatory disorders, such as rheumatoid arthritis (28) and ulcerative colitis (29), the consequences of NO-dependent nitrosylation reactions on cellular proteins *in vivo* remain poorly understood. However, some data, specially from human lung disease (30), suggest that the presence of NTY in the inflamed tissue is a sign of cell damage and not merely an epiphenomenon or a marker of inflammatory activity. Thus, although the pathological potential for the intrahepatic abnormal accumulation of NTY in CVH, as a consequence of NO-mediated oxidative damage to hepatocellular proteins, is considerable, the existence of substantial experimental evidence favoring a protective function for NO in liver inflammation (31-33) indicates that the exact role that NO could play in the pathogenesis of liver damage in CVH remains to be defined and, therefore, deserves further investigation.

Highlighting the pathogenic role that PYT may play in liver disease are the experimental data from D'Ambrosio et al. (27), indicating that a dose-dependent inhibition in the colony-forming capability of human hepatocytes was observed when these cells were treated *in vitro* with NO donor molecules, producing intracellular PYT and resulting in cytotoxicity. Furthermore, the oxidative stress could be important for another pathologic aspect of hepatotropic viral infections, such as the development of hepatocellular carcinoma. Thus, several lines of experimental evidence indicate that either increasing the oxidative DNA damage or inhibiting the DNA repair machinery by toxic oxygen radicals could facilitate the hepadnaviral DNA integration into chromosomal DNA, promoting the process of hepatocarcinogenesis (34,35).

It has been reported that disruption of the hepatocellular oxidant-antioxidant balance may play an important role in the progression of liver disease in viral hepatitis (36,37). The suggestion that N-acetyl cysteine, a potent antioxidant drug, might enhance the response to interferon (38), along with the recently published results showing that, in patients with chronic hepatitis C, response to interferon was positively associated with an improvement in the cellular antioxidant levels (39) further support the former hypothesis that hepatocellular oxidative damage participates in the pathogenesis of virus-induced chronic liver disease. Whether the inclusion of measures leading to reduction of oxidative

stress along with the antiviral therapy could be beneficial for the treatment of some patients with CVH deserves more extensive clinical studies.

### Acknowledgements

This work has been supported by grants from Comunidad de Madrid to C. G-M (AC 68.2/0012/97) and from Fondo de Investigaciones Sanitarias to R. M-O (FIS 97/0233). The institutional and financial support obtained from the Asociación LiverHígado de Investigación Científica is fully acknowledged.

The authors thank Brenda Ashley for her assistance with English, and Rocha Barroso for her expert secretarial help.

### References

1. Hoofnagle JH, Seeff LB. Natural history of chronic type B hepatitis. In: Popper H, Schaffner H, editors. *Progress in Liver Disease*, vol 7. New York: Grune & Stratton; 1984. p. 97-113.
2. Popper H, Shafritz DA, Hoofnagle JH. Relation of the hepatitis B virus carrier state to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1987; 7: 64-72.
3. Alter HJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WI, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992; 327: 1899-905.
4. Bruis J, Barrera JM, Calvet X, Ercilla G, Costa J, Sánchez-Tapias JM, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet* 1989; 2: 1004-6.
5. García-Monzón C, Moreno-Otero R, Pajares JM, García-Sánchez A, López-Botet M, de Landáuzuri MG, et al. Expression of a novel activation antigen on intrahepatic CD8+ T lymphocytes in viral chronic active hepatitis. *Gastroenterology* 1990; 98: 1029-35.
6. Volpes R, Van den Oord JJ, Desmet V. Memory T cells represent the predominant lymphocyte subset in acute and chronic liver inflammation. *Hepatology* 1991; 13: 826-9.
7. Koziel MJ, Dudley D, Wong JT, Dienstag J, Houghton M, Ralston R, et al. Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J Immunol* 1992; 149: 3339-44.
8. Naoumov NV, Fortmann BC, Tedder RS, Ferns B, Eddelston ALWF, Alexander JM, et al. Detection of hepatitis B virus antigens in liver tissue. A relation to viral replication and histology in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1990; 99: 1245-53.
9. Moreno-Otero R, García-Monzón C, García-Sánchez A, García-Buey L, Pajares JM, Di Bisceglie AM. Development of cirrhosis after chronic type B hepatitis: a clinicopathologic and follow-up study of 46 HBeAg-positive asymptomatic patients. *Am J Gastroenterol* 1991; 86: 560-4.
10. Takehara T, Hayashi N, Mita E, Hagiwara H, Ueda K, Katayama K, et al. Detection of the minus strand of hepatitis C virus RNA by reverse transcription and polymerase chain reaction: implication for hepatitis C virus replication in infected tissue. *Hepatology* 1992; 15: 387-90.
11. Hiramoto N, Hayashi N, Haruna Y, Kasahara A, Furumoto H, Mori C, Fuke I, et al. Immunohistochemical detection of hepatitis C virus-infected hepatocytes in chronic liver disease with monoclonal antibodies to core, envelope and NS3 regions of the hepatitis C virus genome. *Hepatology* 1992; 16: 306-11.
12. Majano PL, García-Monzón C, López-Cabrera M, Lara-Pezzi E, Fernández-Ruiz E, García-Iglesias C, et al. Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis. Evidence for a virus-induced gene upregulation. *J Clin Invest* 1998; 101: 1343-52.

13. Mihm S, Fayaz A, Ramadan G. Hepatic expression of inducible nitric oxide synthase transcripts in chronic hepatitis C virus infection: relation to hepatic viral load and liver injury. *Hepatology* 1997; 26: 451-8.
14. Ishropoulos H, Zhu L, Chen J, Tiu M, Martin JC, Smith CD, et al. Peroxynitrite mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298: 431-7.
15. Beckman JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 1996; 9: 436-44.
16. Haddad YI, Ishropoulos H, Holm BA, Beckman JS, Haber JR, Matalon S. Mechanisms of peroxynitrite induced injury to pulmonary surfactant. *Am J Physiol* 1993; 265: L559-64.
17. Beckman JS, Ye YZ, Anderson P, Chen J, Accavitti M, Turpey MM, et al. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1994; 375: 81-8.
18. Singer H, Kawka DW, Scott S, Weidner JR, Mumford RA, Richl TE, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1996; 111: 871-85.
19. Saleh D, Barnes PJ, Glad A. Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1763-9.
20. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Villari D, Caputi AP, Longo G. Evidence for *in vivo* peroxynitrite production in human chronic hepatitis. *Life Sci* 1998; 63: 25-30.
21. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991; 13: 372-4.
22. Kato N, Yokosuka O, Omata M, Hosoda K, Ohto M. Detection of hepatitis C virus ribonucleic acid in the serum by amplification with polymerase chain reaction. *J Clin Invest* 1990; 86: 1764-7.
23. Cabañas C, Sánchez-Madrid E, Acevedo A, Bellón T, Fernández JM, Larraga V, et al. Characterization of a CD11c reactive monoclonal antibody (HCN1) obtained by immunizing with phorbol ester differentiated U937 cell. *Hybridoma* 1988; 7: 167-76.
24. Mason DY, Abdulaziz Z, Falini B, Stein H. Double immunocytochemical labeling. In: Polak J, Van Noorden S, editors. *Immunohistochemistry*. Bristol: PSG Wright; 1983. p. 113-28.
25. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989; 320: 365-76.
26. Graham M. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1994; 344: 859-61.
27. D'Ambrosio SM, Obertyczyn TM, Brady T, Rose MS, Robertson FM. Sensitivity of human hepatocytes in culture to reactive nitrogen intermediates. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 233: 543-9.
28. Kaur H, Helliwell B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett* 1994; 350: 9-12.
29. Katsura H, Horiuchi R, Miura S, Shigematsu T, Hirokawa M, Akiba Y, et al. Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Gut* 1998; 42: 180-7.
30. Haddad YI, Pataki G, Hu P, Galliani C, Beckman JS, Matalon S. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest* 1994; 94: 2407-13.
31. Billiar TR, Hoffman RA, Curran RD, Langrehr JM, Simmons RL. A role for inducible nitric oxide biosynthesis in the liver in inflammation and in the allogeneic immune response. *J Lab Clin Med* 1992; 120: 192-7.
32. Harbricht BG, Billiar TR, Stadler J, Demetris AJ, Ochoa J, Curran RD, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis during endotoxemia promotes intrahepatic thrombosis and an oxygen radical-mediated hepatic injury. *J Leukoc Biol* 1992; 52: 390-4.
33. Pannen BH, Bauer M, Zhang JX, Robotham JL, Clemens MG. A time-dependent balance between endothelins and nitric oxide regulating portal resistance after endotoxin. *Am J Physiol* 1996; 271: H1953-61.
34. Feitelson M. Hepatitis B virus infection and primary hepatocellular carcinoma. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5: 275-301.
35. Petersen J, Daadri M, Burkle A, Zhang L, Rogler CE. Increase in the frequency of hepadnavirus DNA integrations by oxidative DNA damage and inhibition of DNA repair. *J Virol* 1997; 71: 5455-63.
36. Swietek K, Juszczak J. Reduced glutathione concentration in erythrocytes of patients with acute and chronic viral hepatitis. *J Viral Hepat* 1997; 4: 139-41.
37. Larrea E, Beloqui O, Muñoz-Navas MA, Crespo MP, Prieto J. Superoxide dismutase in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 1235-41.
38. Beloqui O, Prieto J, Suarez M, Gil B, Qian CH, Garcia N, et al. N-acetyl cysteine enhances the response to interferon-alpha in chronic hepatitis C: a pilot study. *J Interferon Res* 1993; 13: 279-82.
39. Mutlu-Turkoglu U, Adenoglu E, Turkoglu S, Badur S, Uysal M, Toker G. The effects of interferon-alpha on serum lipid peroxidation and total thiol content in patients with chronic active hepatitis C. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997; 96: 357-61.

**Title:** Hepatitis B virus X protein (HBx) induces inducible nitric oxide synthase (ONSi) gene promoter through the proximal NF- $\kappa$ B-binding site: cytoplasmic location of HBx is essential for iNOS promoter induction.

**Authors:** Pedro L. Majano, Enrique Lara-Pezzi, Manuel López-Cabrera, Arantxa Apolinario, Ricardo Moreno-Otero, and Carmelo García-Monzón<sup>\*</sup>.

**Affiliations:** Liver and Molecular Biology Units, Hospital Universitario de la Princesa; and Hepatology Unit, Hospital Universitario Santa Cristina, both at Universidad Autónoma de Madrid, Spain.

**Running title:** Cytoplasmic HBx protein activates iNOS gene transcription

**Key words:** hepatitis B virus, hepatitis B virus X protein, chronic hepatitis, proinflammatory cytokines, inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, nuclear factor  $\kappa$ B.

**FOOTNOTE PAGE**

**Corresponding author:** Carmelo García-Monzón. Hepatology Unit. Hospital Universitario Santa Cristina. Universidad Autónoma de Madrid. O'Donnell , 28009-Madrid, Spain. Phone: +3491-573 6200. Fax: +3491- 409 6185. E-mail: [garciamonzon@teleline.es](mailto:garciamonzon@teleline.es)

**Abbreviations used in this paper:** HBV: hepatitis B virus. HBx: hepatitis B virus X protein. CHB: chronic hepatitis B. iNOS. inducible nitric oxide synthase. NO: nitric oxide. NF- $\kappa$ B: nuclear factor  $\kappa$ B

**Grant support:** This work has been supported by grants to M.L.-C. from Ministerio de Sanidad y Consumo (FIS 00/0602), to R.M.-O. from Ministerio de Sanidad y Consumo (FIS 99/0358), and to C.G.-M. from Comunidad de Madrid (AC 08.2/0003.1/1999.1). P.L.M. was supported by a predoctoral fellowship from Fundación Gregorio Marañón.

**ABSTRACT**

Nitric oxide appears to play a central role in the pathogenesis of many inflammatory disorders. We have previously shown that there is an enhanced intrahepatic expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene during chronic hepatitis B virus infection, and that viral X protein (HBx) transcriptionally activates this cellular gene, but the molecular basis for this activation remained to be defined. We aimed to explore the involvement of different cis-acting elements of the human ONSi promoter in the HBx-mediated upregulation as well as the effect of the intracellular distribution of the HBx on its trans-acting function. Cotransfection of human hepatocyte-derived cells with wild-type or mutated iNOS promoter and with a HBx expression vector demonstrated that functional inactivation of the proximal nuclear factor  $\kappa$ B-binding site of the iNOS promoter markedly reduced the HBx-mediated transcriptional activity. Mobility shift assays showed an increased DNA-protein complexes comprised mainly by the p50 and p65 members of NF- $\kappa$ B family in the nuclear extracts from HBx-transfected cells. Transient transfection experiments with HBx-expressing plasmids containing distinct cellular localization sequences showed that cytoplasmic location of this viral protein activated the iNOS promoter but when HBx was targeted to the nucleus, the HBx-induced luciferase activity was almost completely abrogated. In conclusion, cytoplasmic location of HBx protein is essential for the transcriptional activation of the iNOS gene through the nuclear translocation of p50-p65 heterodimers.

## INTRODUCTION

Nitric oxide (NO) is a highly reactive gaseous molecule that plays an important role in the non-specific immune response to infection, acting as antimicrobial (1). However, a long-term production of large amounts of NO due to overexpression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene can have detrimental consequences, such as cytotoxicity and carcinogenesis (2,3). Further supporting this assumption, we have recently demonstrated that the expression of iNOS was markedly enhanced by hepatitis B virus (HBV) infection in hepatocytes from patients with chronic hepatitis B (CHB) (4) and, as expected, an intrahepatic accumulation of NO-derived reactive species closely associated with histological severity of liver disease was also observed in patients with chronic HBV infection (5), suggesting that NO could mediate important pathogenic events in the course of HBV infection.

Cloning and functional analysis of the human iNOS gene promoter identified two copies of nuclear factor (NF)  $\kappa$ B response elements, one located -102 base pairs proximal to the transcription initiation site and the other as distal as -8270 base pairs upstream. Furthermore, two copies of activator protein 1 (AP-1) binding sites have also been found (6). Although it has been suggested that HBV X protein (HBx) transactivates the iNOS gene promoter through the induction of NF- $\kappa$ B (7), the mechanism of this activity remains only partially understood. It is conceivable, therefore, that understanding how HBx activates the iNOS gene transcription can provide insights into the pathogenic role of the enhanced intrahepatic iNOS expression that we observed in patients with CHB (4,5).

The HBV genome encodes a small protein known as HBx (8), which is essential for viral infectivity (9) and is a potential cofactor in HBV-mediated carcinogenesis (10,11). In addition, it has been shown that HBx behaves as a transcriptional transactivator of a

number of viral and cellular gene promoters through direct interaction with transcriptional factors, such as the RPB5 subunit of RNA polymerase II (12), TATA-binding protein (13) and ATF/CREB (14), and activation of signal transduction pathways, such as the Ras/Ra/MAP kinase cascade (15). In this regard, the role of the intracellular distribution of HBx still remains controversial, but recent data from Doria et al (16) suggest that HBx could have a dual function on transcription machinery, acting on signal transduction pathways in the cytoplasm and transcription factors in the nucleus. The same authors have demonstrated that the cytoplasmic distribution of HBx was associated with AP-1 and NF- $\kappa$ B activation.

NF- $\kappa$ B is a ubiquitous transcription factor and a pleiotropic regulator of numerous immune responses implicated in acute and chronic inflammation (17). It is found in the cytoplasm of numerous cell types as a trimeric complex, consisting of p65, p50 and inhibitor  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) subunits (18). In response to diverse stimuli, including inflammatory cytokines and mitogens as well as distinct viral proteins, the two major forms of I $\kappa$ B proteins, termed I $\kappa$ B  $\alpha$  and  $\beta$  can be phosphorylated, ubiquitinated and subsequently degraded (18). The release of I $\kappa$ B from the trimer results in the nuclear import of the p50-p65 heterodimer where it binds to DNA, activating the transcription of a number of genes that play a key role in the immune and inflammatory responses (19).

In this paper, given that iNOS expression appears to be regulated, at least in part, through NF- $\kappa$ B response elements and HBx is able to activate transcription of gene promoters bearing NF- $\kappa$ B binding sites, we aimed to study the basis for this HBx activity exploring the effect of the intracellular distribution of this protein on its trans-acting function as well as the involvement of NF- $\kappa$ B proteins in the HBx-mediated iNOS promoter upregulation.

## MATERIAL AND METHODS

### Cell Culture.

Human hepatoma HepG2 cells, 2.2.15 cell line, which is a stably-transfected derivative from HepG2 developed by transfection with a dimerized HBV genome, and Chang liver (CCL13) cells were grown at 37 °C with a 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine and 50 µg/ml gentamycin (20 mg/ml). The 2.2.15 cells were cultured in the presence of 1 mg/ml of G418 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) to maintain integrated HBV sequences. CMO and CMX clones were generated by stable transfecting CCL13 cells with plasmids pMMTV-CAT and pMMTV-X, respectively, which drive the expression of chloramphenicol acyl transferase (CAT) or HBx in a glucocorticoid-inducible manner (20). Clones were selected in the presence of 0.2 mg/ml hygromycin (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Where indicated, CMO and CMX cells were treated with 1 µM of the water analog of dexamethasone D-2915 (Sigma, St Louis, MO). In order to confirm the results obtained with these transfectants, different clones of CMO and CMX cells were used in each experiment.

To induce iNOS expression once cells were subconfluent, the medium was changed, and cells were incubated with a cytokine mixture (CM) containing human recombinant TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IFN- $\gamma$  at different concentrations (50, 100, 250 or 500 UI/ml each).

### Plasmids.

The reporter plasmid pGL3-NOS 8.3, containing 8.3 kb of the human iNOS promoter cloned into the pGL3-basic luciferase reporter gene vector (Promega, Madison, WI), and the plasmids -NF- $\kappa$ Bd, -NF- $\kappa$ Bu, -NF- $\kappa$ Bd/u, -AP-1d, -AP-1u, and -AP-1d/u (kindly provided by Dr. Joel Moss, National Institute of Health, Bethesda, MD)



containing single or double mutations at different transcription factor-binding sites have been previously described (6). The expression vectors pSV X and pSV Hyg, harboring the X open reading frame and the bacterial hygromycin phosphotransferase, respectively, under the control of SV40 early promoter/enhancer, have been described elsewhere (21) and were kindly provided by Dr. Massimo Levrero (I Clinica Medica and Fondazione Andrea Cesalpino, Policlinico Umberto I, Rome, Italy). The plasmids, pProLuc, containing a minimal rat prolactin promoter, and pAPIPro-Luc, which contains the same promoter and four copies of the human collagenase TRE site (22), were a gift of Dr R.A. Flavell (Howard Hughes Medical Institute, Yale University, New Haven, CT). The plasmid pNLS-XFlag, containing the HBx gene and the insert encoding for the Flag peptide together with a nuclear localization sequence from SV40 T-Ag and the plasmid pSLN-XFlag with the sequence mutated to render a non-functional nuclear import sequence have been described previously (16). The empty vector pCEP4 (Invitrogen) was used as control.

#### **Transfection and luciferase assay.**

Cells were transiently transfected using FuGENE<sup>TM</sup> transfection reagent (Boehringer Mannheim) with a construct containing the luciferase reporter gene according to the manufacturer's guide. Briefly, after 50% confluency, cells were transfected with the relation 1  $\mu$ gr of DNA of the reporter plasmids and 3 ml of FuGENE reagent for 6 hours at 37°C, then cells were washed and fresh medium was added. After 36 hours, the medium was replaced with fresh medium containing the CM as described before. Cells were then harvested 8 hours later, and luciferase activity was determined using a Dual Luciferase Assay System Kit (Promega). Briefly, cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and lysed by adding 250  $\mu$ l of a lysis buffer (Promega). After 15 minutes at room temperature, the lysate was removed and centrifugated. To 20  $\mu$ l of

supernatant, 100 µl of a luciferase assay reagent was added, and firefly luciferase activity was measured in a Lumat LB9501 luminometer (Berthold, Wildbad, Germany) and normalized to transfection efficiency, which was determined by Renilla luciferase activity according to the manufacturer's guide.

#### **Preparation of cell extracts and electrophoretic mobility shift assay.**

Cytosolic and nuclear extracts were obtained from cells grown to 70% confluency in 150 mm<sup>2</sup> dishes and treated with CM for 1 hour. All extraction and binding reactions using 3 µg of nuclear proteins were performed exactly as previously described (20). For competition, a 40 to 130-fold excess of unlabeled oligonucleotide was added to the reaction prior to the addition of the probe. The DNA-protein complexes were resolved by electrophoresis on 4 or 5 % polyacrylamide gels. The oligonucleotide (and their complementary) used were:

NFκB NOS1            d GGCTGGGGACACTCCCTTT.

NFκB NOS1mut        d GGCTGATAACTAΔACTTT.

For supershift assays, 0.5 ml of polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) raised against the following NF-κB family members RelA, p-50, C-rel, rel-B and p-52, were added 20 minutes prior to the labeled probe.

#### **Indirect immunofluorescence.**

Cells were plated on coverlips and were grown overnight. Cells were then transfected with the plasmids pNLS-XFlag and pSLN-XFlag. Thirty-six hours after transfection, subcellular localization of HBx was analyzed by immunofluorescence with anti-Flag antibodies (Santa Cruz Biotechnology). Briefly, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes at room temperature, permeabilized 5 minutes in PBS containing 0.1% NP-40 (wash buffer), blocked 30 minutes at 37 °C with TNB

(Boehringer Mannheim), and incubated 1 hour with 1:100 dilution for anti-Flag antibodies. Cells were then washed 3 times in wash buffer and labeled with a fluorescein isothiocyanate-conjugated rabbit anti-mouse (Dakopatts, Glostrup, Denmark) at 1:100.

## RESULTS

### **Effect of cytokines and HBx on iNOS promoter activity.**

We have previously described that both cytokines and HBx induced iNOS gene expression and that both exerted a synergistic effect (5). To analyze whether these effects were regulated at the transcriptional activity of iNOS promoter, human hepatocyte-derived cell lines were transiently cotransfected with 0.5  $\mu$ g of the iNOS-luciferase construct and 2.5  $\mu$ g of the HBx expression vector, pSV-X, and then stimulated or not with different CM concentrations (50, 100, 250 and 500 UI/ml). Interestingly, only an additive effect of HBx was observed with CM at 50 and 100 UI/ml in both HepG2 (Figure 1A) and Chang liver cells (Figure 1B). This effect was not observed at either 250 or 500 UI/ml. Therefore, the induction of iNOS promoter by CM and/or HBx did not mirror the effect of these stimuli on iNOS gene expression, indicating that additional transcriptional and/or post-transcriptional processes may also be involved in the inducible expression of iNOS gene.

### **Effect of mutations in NF- $\kappa$ B and AP-1 binding sequences of the iNOS gene on cytokines and HBx-stimulated induction of promoter activity.**

To map the cytokines and HBx-responsive sequences of the iNOS promoter, iNOS promoter-derived plasmids containing single or double mutations at different NF- $\kappa$ B or AP-1 binding sites and a HBx-expression vector were cotransfected and were stimulated or not with CM for 8 hours. After transient transfection, the CM and HBx-mediated induction of wild-type (wt) vector in HepG2 cells was 7- and 3-fold over the basal values (Figure 2A), respectively, whereas in Chang liver cells was of 4- and 2.5-fold (Figure 2B). In agreement with previous results, single or double mutations at the NF- $\kappa$ B or AP-1 binding sites significantly reduced CM-mediated induction. Interestingly,

in part, of the enhanced iNOS expression observed in the cytoplasm of liver cells from these patients (4), favoring the hypothesis that some of the HBx activities, such as cofactor in hepatocarcinogenesis (34), could be partially explained by inducing a long-term intrahepatic overproduction of NO.

The functional role of NO produced by hepatocellular iNOS in the course of chronic HBV infection is unknown. The natural history of this infection is featured by causing chronic hepatitis, an inflammatory liver disease characterized by the parenchymal infiltration of activated T lymphocytes (27), with the subsequent risk to develop cirrhosis and hepatocellular carcinoma (35). Among the biological effects of NO are antiviral (36), pro-angiogenic (37), and carcinogenic (38). The antiviral effect of NO would explain, at least in part, the increase in viral titers observed when corticoids, which are iNOS inhibitors (39), are used in patients with chronic hepatitis B (40). Regarding the pro-angiogenic effect of NO, a pathogenic link may exist between the enhanced intrahepatic iNOS expression and the existence of an active process of portal angiogenesis in patients with CHB (41). Finally, it is well known that high levels of NO can cause deamination of DNA bases, leading to DNA damage as well as mutation in human cells (3,38), and it has been demonstrated more recently that NO is able to induce functional modifications of p53 tumor-suppressor protein (42), increasing the risk of malignant cell transformation. Therefore, a possible pathogenic mechanism by which chronic HBV infection increases the risk of liver cancer might be that the disruption of p53 activity by interactions with large amounts of HBx-induced NO or with HBx itself (43) would produce a loss in p53-mediated apoptosis (33), leading to the development of neoplastic cell growth.

The increasing evidence that NO may mediate important pathological events in the course of CHB suggests that NO-targeted therapies might have beneficial effects in this

inflammatory liver disease. However, administration of non-selective iNOS inhibitors increased mortality and decreased tissue perfusion in animal models of endotoxin shock and hepatic ischemia-reperfusion injury (44,45), suggesting that more specific iNOS inhibitors are required to determine whether selective iNOS inhibition may be beneficial. Given that NF- $\kappa$ B proteins activate hepatic iNOS expression, as we demonstrated in this work, the NF- $\kappa$ B-directed therapies might be effective in chronic hepatitis. This view is supported by the effects of various therapeutic strategies aimed at blocking NF- $\kappa$ B activity (46,47). Of some concern is the potential for toxicity since NF- $\kappa$ B blockade could result in liver apoptosis, particularly in the presence of TNF- $\alpha$  (19). This issue is clearly relevant in chronic viral hepatitis where hepatocellular TNF- $\alpha$  overexpression occurs (24). The recent identification of a pathogenic role for specific subsets of NF- $\kappa$ B family, such as IKK- $\beta$  and p65, in different inflammatory diseases (19) will be essential in developing specific therapeutics. On the basis of our results, the apparent importance of p65 activating hepatic iNOS gene expression in CHB suggests that therapeutic strategies targeted at this protein could be useful. This assumption may be extended to patients with chronic infection by hepatitis C virus, since we have also observed an intrahepatic iNOS expression in patients with chronic hepatitis C (4).

In conclusion, we have demonstrated in this paper that cytoplasmic location of HBx is essential for the transcriptional activation of the iNOS gene through the nuclear translocation of p50-p65 heterodimers, indicating that NF- $\kappa$ B family proteins could play a key role in the detrimental effects of NO in the course of chronic infection by HBV. Combination of specific NF- $\kappa$ B inhibitors with antiviral agents should offer significant potential for the treatment of virus-induced chronic liver diseases.

**Acknowledgments:** We are very grateful to Dr. D.A. Geller and Dr. J. Moss for providing us with critical reagents. The expert English technical assistance of Brenda Ashley and the secretarial help of Rocha Barroso are also acknowledged.

## REFERENCES.

- 1.- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002-2012.
- 2.- Lyons CR. The role of nitric oxide in inflammation. *Adv Immunol* 1995;1995;60:323-371.
- 3.- Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wahnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3030-3034.
- 4.- Majano PL, García-Monzón C, López-Cabrera M, Lara-Pezzi E, Fernández-Ruiz E, García-Iglesias C, Borque MJ, et al. Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis. Evidence for a virus-induced gene upregulation. *J Clin Invest* 1998; 101: 1343-1352.
- 5.- García-Monzón C, Majano PL, Zubia I, Sarz P, Apolinario A, Moreno-Otero R. Intrahepatic accumulation of nitrotyrosine in chronic viral hepatitis is associated with histological severity of liver disease. *J Hepatol* 2000;32:331-338.
- 6.- Marks-Koneczalik J, Chu SC, Moss J. Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both Activator Protein 1 and Nuclear Factor- $\kappa$ B-binding sites. *J Biol Chem* 1998; 273: 22201-22208.
- 7.- Amaro MJ, Bartolomé J, Carreño V. Hepatitis B virus X protein transactivates the inducible nitric oxide synthase promoter. *Hepatology* 1999;915-923.
- 8.- Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985; 317:489-495.
- 9.- Chen HS, Kaneko S, Girones R, Anderson RW, Hornbockle WE, Tennant BC, Cote PJ, et al. The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks. *J Virol* 1993;67:1218-1226.
- 10.- Koike K. Hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis. *Intervirology* 1995;38:134-142.
- 11.- Feitelson MA, Duan LX. Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 1997; 150:1141-1157.
- 12.- Cheong JH, Yi MK, Lin Y, Murakami S. Human RPB5, a subunit shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases, binds human hepatitis B virus X protein and may play a role in X transactivation. *EMBO J* 1995;14:143-150.
- 13.- Qadri Y, Maguire HF, Siddiqui A. Hepatitis B virus transactivator protein X interacts with the TATA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1003-1007.
- 14.- Maguire HF, Hoeffler JP, Siddiqui A. HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science* 1991;252:842-844.
- 15.- Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signalling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10350-10354.
- 16.- Doria M, Klein N, Lucito R, Schneider RJ. The hepatitis B virus HBx protein is a dual specificity cytoplasmic activator of Ras and nuclear activator of transcription factors. *EMBO J* 1995; 14:4747-4757.
- 17.- Baldwin AS, Jr. The transcription factor NF- $\kappa$ B and human disease. *J Clin Invest* 2001;107:3-6.
- 18.- Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649-683.
- 19.- Tak PP, Firestein GS. NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001;107:7-11.



- 20.- Lara-Pezzi E, Majano PL, Yáñez-Mo M, Gómez-Gonzalo M, Carretero M, Moreno-Otero R, Sánchez-Madrid F, López Cabrera M. Effect of the hepatitis B virus HBx on protein-mediated adhesion to and migration on extracellular matrix. *Journal of Hepatology* (in press).
- 21.- Chirillo P, Falco M, Puri PL, Artini M, Balsano C, Leviero M, Natoli G. Hepatitis B virus pX activates NF- $\kappa$ B dependent transcription through a Raf-independent pathway. *J Virol* 1996;70:641-646.
- 22.- Rincón M, Flavell RA. AP-1 transcriptional activity requires both T-cell receptor-mediated and co-stimulatory signals in primary T lymphocytes. *EMBO J* 1994;13:4370-4381.
- 23.- García-Monzón C, García-Buey L, García-Sánchez A, Pajares JM, Moreno-Otero R. Down-regulation of intercellular adhesion molecule 1 on hepatocytes in viral chronic hepatitis treated with interferon-alpha 2b. *Gastroenterology* 1993;105:462-469.
- 24.- González-Amaro R, García-Monzón C, García-Buey L, Moreno-Otero R, Alonso JL, Yagüe E, Pivel JP, et al. Induction of tumor necrosis  $\alpha$  production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis. *J Exp Med* 1994;179:841-848.
- 25.- Yokoo T, Kitamura M. Dual regulation of IL-1 beta-mediated matrix metalloproteinase-9 expression in mesangial cells by NF- $\kappa$ B and AP-1. *Am J Physiol* 1996;270:F123-F130.
- 26.- Han ZN, Boyje DL, Manning AM, Firestein GS. AP-1 and NF-kappa B regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity* 1998;28:197-208.
- 27.- Tülg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nölchen B, Judmaier G, Huber C. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1992;103:264-274.
- 28.- Moreno-Otero R, García-Buey L, Mateos FG, García-Monzón C. Pathogenesis of chronic viral hepatitis: Lessons from immunohistochemistry. *Viral Hepatitis Rev* 1996;2:61-79.
- 29.- Lara-Pezzi E, Majano PL, Gómez-Gonzalo M, García-Monzón C, Moreno-Otero R, Leviero M, López-Cabrera M. The hepatitis B virus X protein up-regulates tumor necrosis factor  $\alpha$  expression in hepatocytes. *Hepatology* 1998;28:1013-1021.
- 30.- Natoli G, Avantaggiati ML, Chirillo P, Puri PL, Ianni A, Balsano C, Leviero M. Ras- and raf-dependent activation of c-jun transcriptional activity by the hepatitis B virus transactivator pX. *Oncogene* 1994;9:2837-2843.
- 31.- Wang WL, London WT, Lega L, Feitelson MA. HBxAg in the liver from carrier patients with chronic hepatitis and cirrhosis. *Hepatology* 1991;14:29-37.
- 32.- Su Q, Shroder C, Hofmann W, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P. Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1998; 27:1109-1120.
- 33.- Murakami S. Hepatitis B virus X protein: Structure, function and biology. *Intervirology* 1999;42:81-99.
- 34.- Koike K, Moriya K, Iino S, Yotsuyanagi H, Endo Y, Miyamura T, Kurokawa K. High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocellular carcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 1994;19:810-819.
- 35.- Moreno-Otero R, García-Monzón C, García-Sánchez A, García-Buey L, Pajares JM, Di Bisceglie A. Development of cirrhosis after chronic type B hepatitis: a clinicopathologic and follow-up study of 46 HBeAg-positive symptomatic carriers. *Am J Gastroenterol* 1991;86:1538-1542.
- 36.- Guidotti LG, McClary H, Loudis JM, Chisari FV. Nitric oxide inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J Exp Med* 2000;191:1247-1252.

- 37.- Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, et al. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest* 1994;94:2036-2044.
- 38.- Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, et al. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 1991;254:1001-1003.
- 39.- Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:10043-10047.
- 40.- Scullard GH, Smith CI, Merigan TC, Robinson WS, Gregory PB. Effects of immunosuppressive therapy on viral markers in chronic active hepatitis B. *Gastroenterology* 1981;81:987-991.
- 41.- García-Monzón C, Sánchez-Madrid F, García-Buey L, García-Arroyo A, García-Sánchez A, Moreno-Otero R. Vascular adhesion molecule expression in viral chronic hepatitis: evidence of neoangiogenesis in portal tracts. *Gastroenterology* 1995;108:231-241.
- 42.- Calmels S, Hainaut P, Ohshima H. Nitric oxide induces conformational and functional modifications of wild-type p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res* 1997;57:3365-3369.
- 43.- Elmore LW, Hancock AR, Chang SF, Wang XW, Chang S, Callahan CP, Geller DA, et al. Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:14707-14712.
- 44.- Minnard EA, Shou J, Naama H, Cech A, Gallagher H, Daly JM. Inhibition of nitric oxide synthesis is detrimental during endotoxemia. *Arch Surg* 1994;129:142-148.
- 45.- Liu P, Yin K, Nagele R, Wong PYK. Inhibition of NOS attenuates peroxynitrite generation, but augments neutrophil infiltration in hepatic ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;284:1139-1146.
- 46.- Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Büschenfelde KH, Strober W. Local administration of antisense phosphorothionate oligonucleotides to the p65 subunit of NF- $\kappa$ B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med* 1996;2:998-1004.
- 47.- Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 2001 (in press).

**FIGURE LEGENDS**

**FIGURE 1:** An additive effect of both HBx (pSVX) and cytokines (CM) on iNOS promoter activity is observed at 50 and 100 UI/ml in HepG2 (panel A) and Chang liver (CCL13) cells (panel B), but not at 250 or 500 UI/ml. The luciferase activity is represented as fold induction on the values obtained in the absence of pSVX and cytokines stimulation (empty bars). Data are represented as mean of values from four experiments  $\pm$  standard error.

**FIGURE 2.** Effect of mutations in NF- $\kappa$ B- and AP-1-binding sites of the iNOS promoter on HBx- and cytokine (CM)-mediated induction of promoter activity. In HepG2 (panel A) as well as in Chang liver (CCL13) cells (panel B), a point mutation in the proximal NF- $\kappa$ B-binding site (NF- $\kappa$ B d) near completely abrogates the HBx-mediated transactivation, whereas disruption of whichever AP-1 sites affects predominantly to the cytokine-induced response but with minimal effect on the HBx-associated promoter activity. The luciferase activity is represented as fold induction on the values obtained in the absence of pSVX and cytokines stimulation to each plasmid (empty bars). Data are represented as mean of values from four experiments  $\pm$  standard error. WT: wild-type iNOS promoter. NF- $\kappa$ B u: mutated distal NF- $\kappa$ B binding site of iNOS promoter. AP-1 d: mutated proximal AP-1 binding site of iNOS promoter. AP-1 u: mutated distal AP-1 binding site of iNOS promoter.

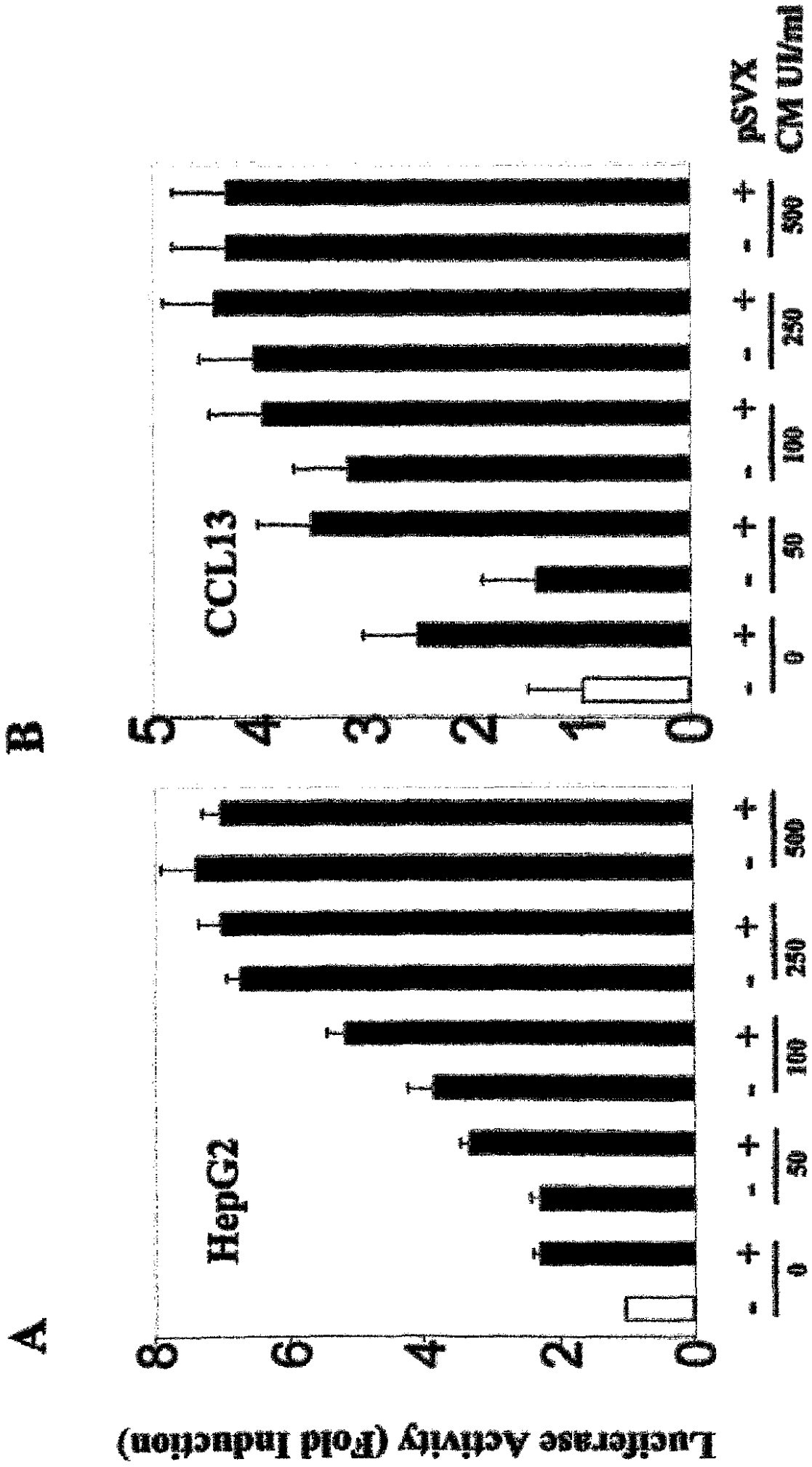
**FIGURE 3.** HBV and HBx induces the formation of NF- $\kappa$ B containing DNA-binding complexes. Interestingly, the expression level of these DNA-protein complexes is higher in 2.2.15 (panel A) and CMX cells (panel B) than in HepG2 (panel A) and CMO cells (panel B), respectively. Competition experiments (panel C) using an excess of either an unlabeled oligonucleotide bearing the wild-type (WT) proximal NF- $\kappa$ B-binding site

of iNOS promoter or an unlabeled oligonucleotide bearing a point mutation in that proximal NF- $\kappa$ B-binding site (mut) (panel C) confirm the specificity of DNA-binding complexes. CM: cytokine mixture. Dex: dexamethasone. Comp: competition.

**FIGURE 4.** In HBV-transfected (panel A) and HBx-transfected (panel B) cells, p50 and p65 comprise mainly the DNA-NF- $\kappa$ B protein complexes, as demonstrated by supershifted bands generated when adding anti-p50 and anti-p65 to nuclear extracts from 2.2.15 CM-stimulated cells (lanes 2 and 3, panel A) and CMX CM-stimulated cells (lanes 2,3, panel B). -: irrelevant antibody.

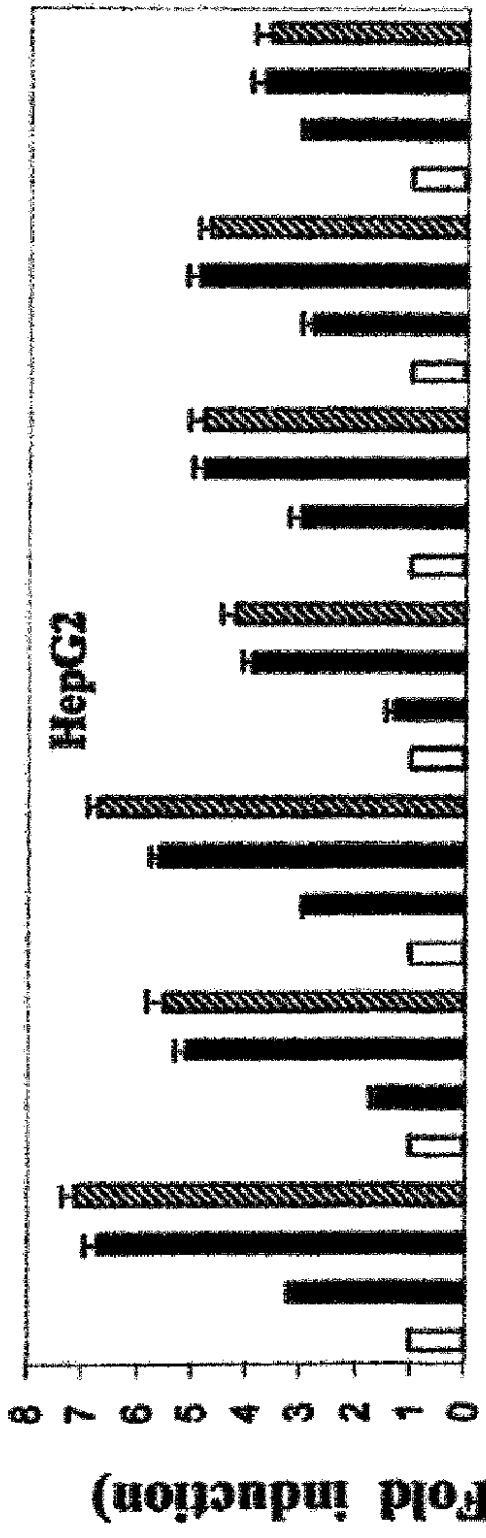
**FIGURE 5.** Influence of HBx localization on HBx-mediated iNOS promoter activation. Noteworthy, cytoplasmic but not nuclear HBx transactivates the iNOS promoter, as shown by the fact that when HBx is targeted to the nucleus (panel A, right), the HBx-induced luciferase activity is near completely abrogated (panel B). Immunofluorescence results shown are representative of three independent experiments. The luciferase activity is represented as fold induction on the values obtained using an empty vector pCEP4. Data are represented as mean of values from three independent experiments  $\pm$  standard error. NLS: HBx-expressing vector with a nuclear localization sequence. SLN: HBx-expressing vector with the nuclear sequence mutated.

# FIGURE 1

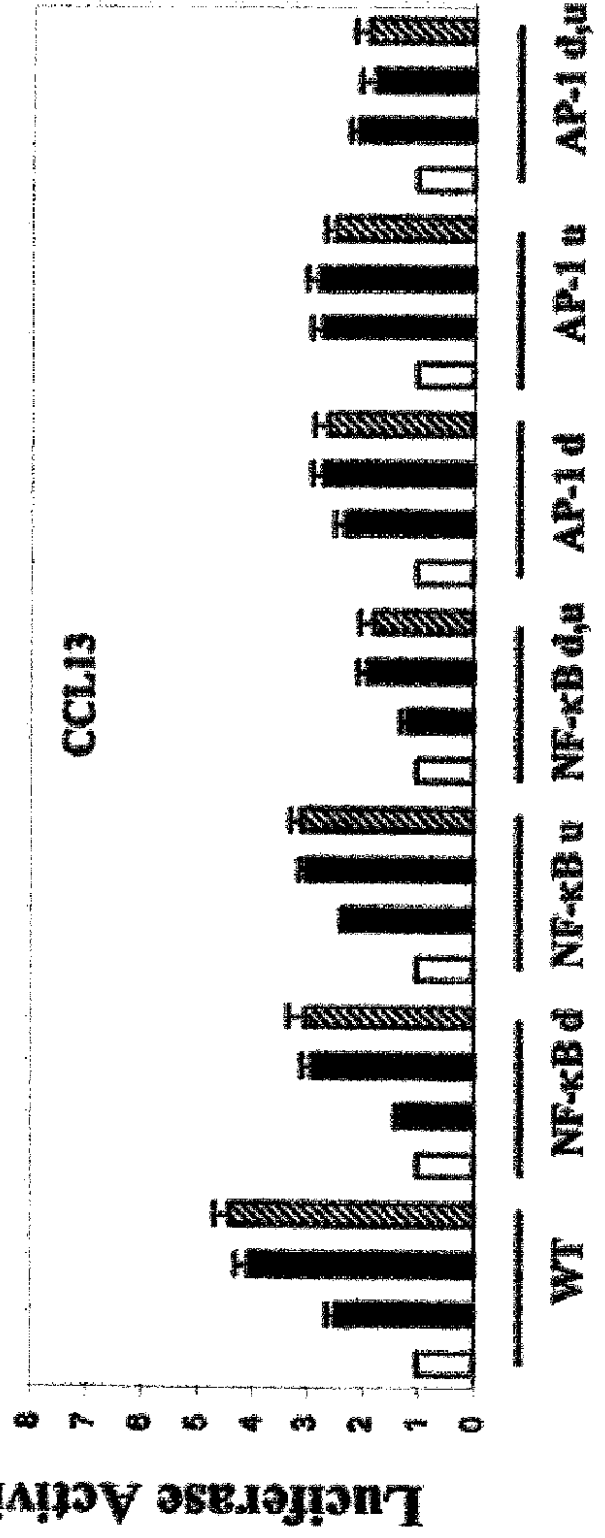


# FIGURE 2

**A**



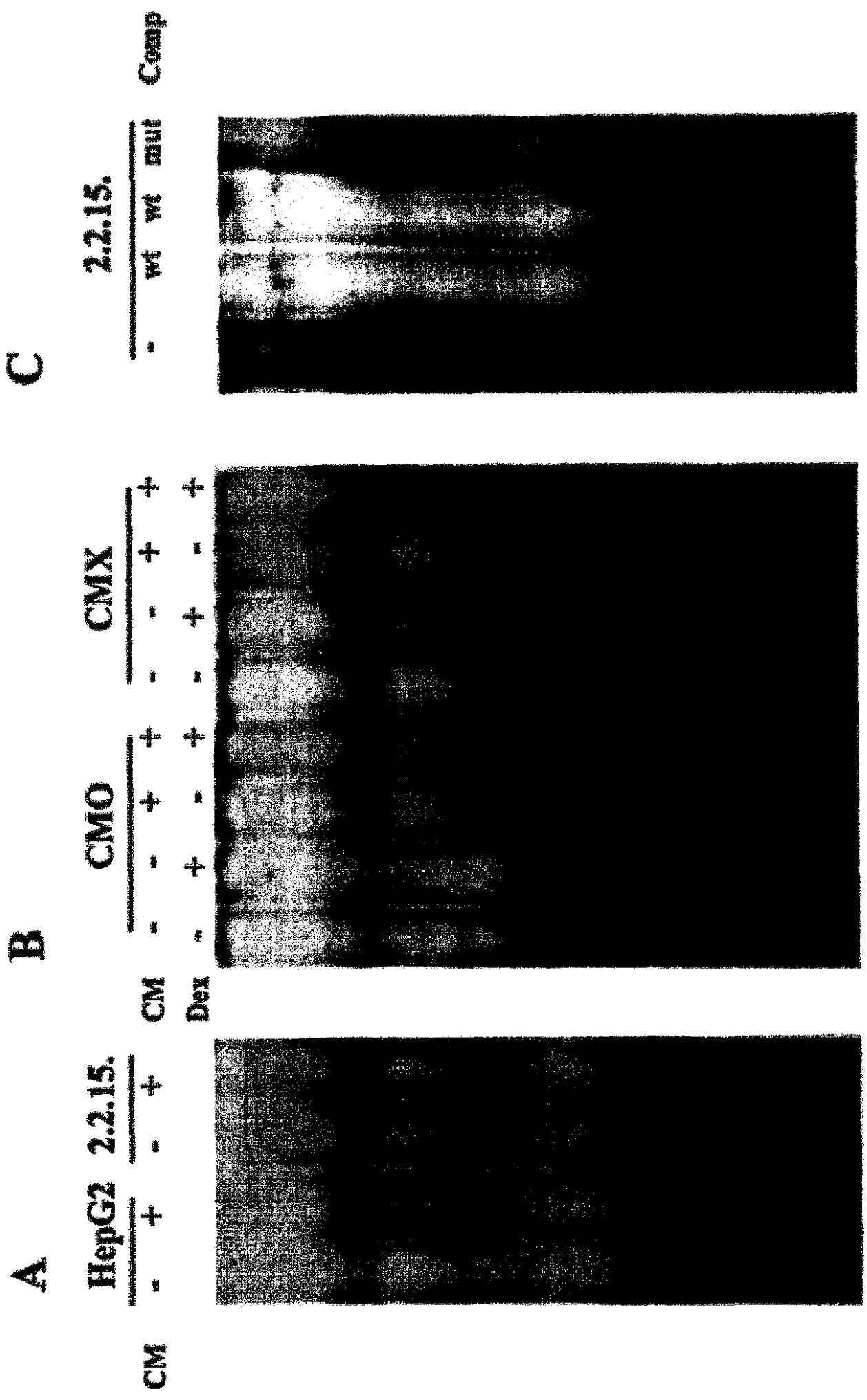
**B**



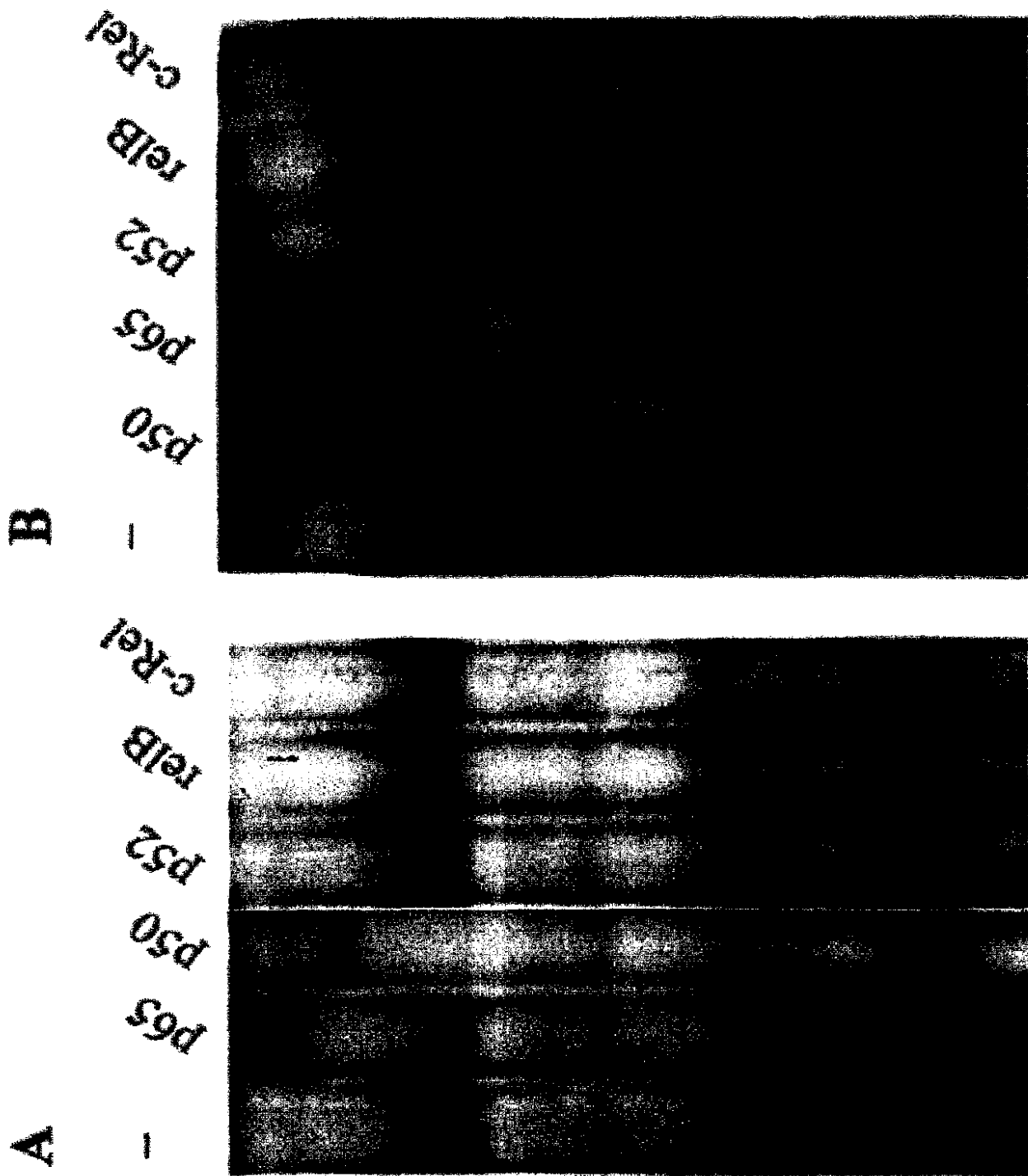
□ -  
 ■ HBx  
 ■ CM  
 ▨ HBx+CM

Luciferase Activity (Fold induction)

# FIGURE 3



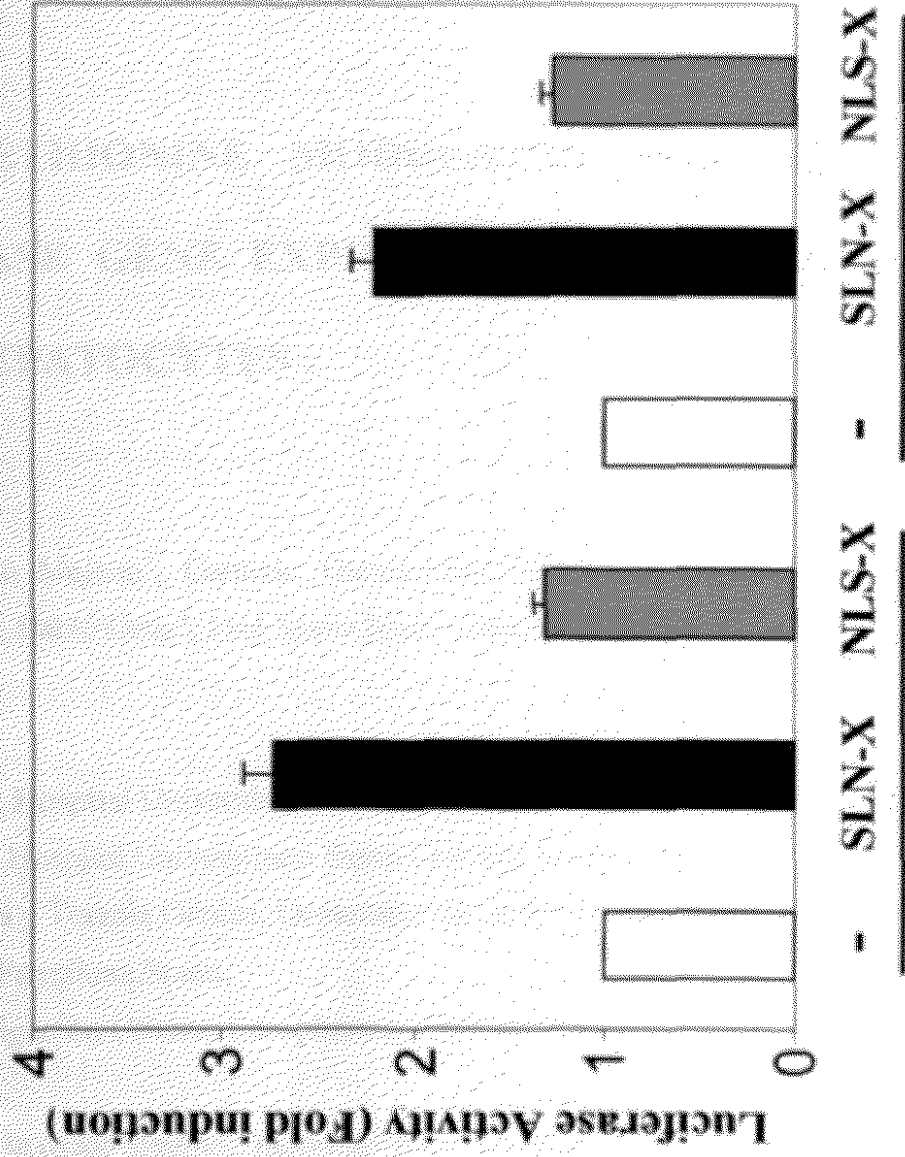
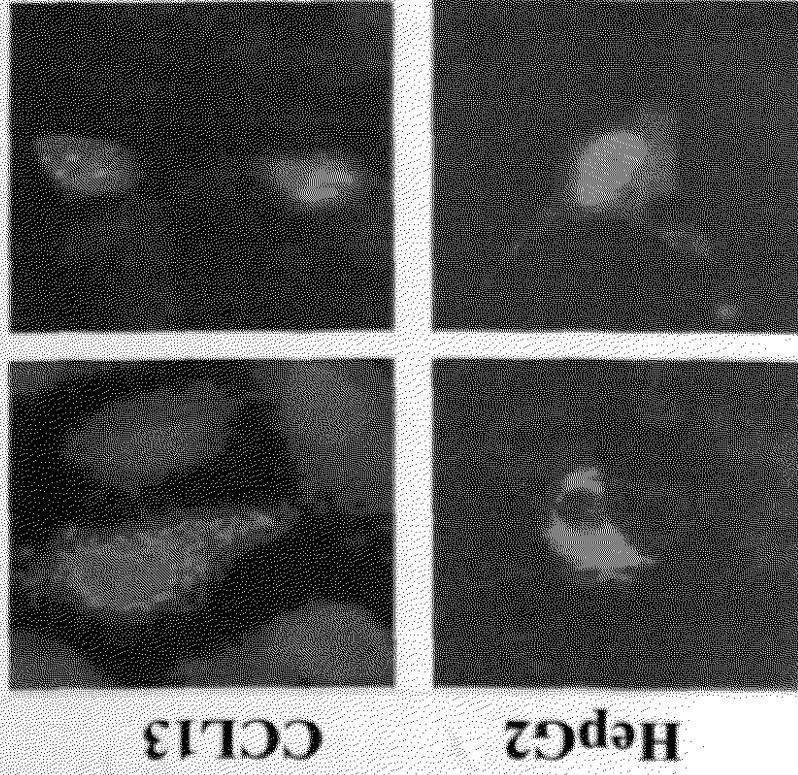
# FIGURE 5





# FIGURE 5

SLN-X      NLS-X



HepG2

CCL13

# **S-ADENOSYLMETHIONINE MODULATES INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE GENE EXPRESSION IN RATS AND IN RAT AND HUMAN HEPATOCYTES .**

**Authors:** Pedro Lorenzo Majano<sup>1</sup>, Carmelo García-Monzón<sup>2</sup>, Elena García-Trevijano<sup>3</sup>, Fernando Corrales<sup>3</sup>, Javier Cámara<sup>4</sup>, Pablo Ortiz<sup>4</sup>, José María Mato<sup>3</sup>, Matías Avila<sup>3</sup>, Ricardo Moreno-Otero<sup>1\*</sup>.

**Affiliations:**

<sup>1</sup> Unidad de Hepatología, Hospital Universitario de la Princesa, Universidad Autónoma, Madrid. Spain.

<sup>2</sup> Unidad de Hepatología, Hospital Universitario Santa Cristina, Madrid. Spain.

<sup>3</sup> División de Hepatología y Terapia Génica, Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Navarra, Pamplona. Spain.

<sup>4</sup> Departamento de Investigación Clínica. Europharma, Madrid. Spain.

**Short title:** Inducible nitric oxide synthase modulation by AdoMet.

**Key words:** S-Adenosylmethionine, inducible nitric oxide synthase, septic shock, cytokines.

**\* Corresponding author: Ricardo Moreno Otero. Unidad de Hepatología. Hospital Universitario de la Princesa. Diego de León 62; 28006-Madrid, Spain. Phone and Fax: 34-91-3093911.**

**E-mail: morenootero@teleline.es**

**Grant Support:** This work has been supported by grants to R.M.O. from Ministerio de Sanidad y Consumo (FIS 99/0358), to C.G.M. from Comunidad de Madrid (AC 08.2/0003.1/99), and to J.M.M. and M.A.A. from Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF 98/0132 and SAF 99/0038), Gobierno de Navarra (681/2000) and National Institute of Health (AA12677-01A1). P.L.M. was supported by a predoctoral fellowship from Fundación Gregorio Marañón.

**Abbreviations:** iNOS, inducible nitric oxide synthase; AdoMet, S-adenosylmethionine; NO, nitric oxide; LPS, lipopolysaccharide; CM, cytokine mixture; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha; IL-1 $\beta$ , interleukin 1 beta; IFN- $\gamma$ , interferon gamma; NF- $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ B; I $\kappa$ B, inhibitor  $\kappa$ B; GSH, glutation; mRNA, messenger RNA.

**ABSTRACT.**

Overproduction of nitric oxide by the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS) is associated with the pathogenesis of acute and chronic liver diseases. iNOS expression can be induced by lipopolysaccharide in rats and proinflammatory cytokines in hepatocytes. S-Adenosylmethionine (AdoMet) has beneficial clinical effects in several liver disorders including cirrhosis and cholestasis. Furthermore, AdoMet is able to modify the expression of factors implicated in iNOS induction such as tumor necrosis factor- $\alpha$ . Hence, in this study we have investigated the effect of AdoMet on iNOS expression. We observed a reduction in the lipopolysaccharide-induced liver iNOS protein expression when rats were pretreated with AdoMet. Furthermore, a dose-dependent inhibition of cytokine-induced iNOS mRNA and protein expression when rat hepatocytes were preincubated with AdoMet was also observed. Additionally, AdoMet was able to inhibit the cytokine-mediated nuclear factor  $\kappa$ B activation, pivotal regulator of iNOS expression, inducing and modifying the kinetic of resynthesis of inhibitors  $\kappa$ B. Finally, we analyzed the effect of AdoMet in a human hepatocyte-derived cell line. AdoMet reduced the cytokine-mediated iNOS mRNA and protein induction in HepG2 cells. Transient transfection experiments with a plasmid containing the human iNOS gene promoter suggested that the inhibitory effect could be mediated, at least in part, at the transcriptional level. In conclusion, AdoMet partially inhibits the LPS-induced liver iNOS expression in vivo and the cytokine-mediated induction of iNOS in vitro, and this effect could contribute to the cytoprotective actions exerted by AdoMet.

## INTRODUCTION.

The expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) enzyme plays an important role as a mediator of immune and inflammatory processes (1). Increased iNOS expression has been observed in many acute and chronic diseases including hemorrhagic shock, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, and chronic viral hepatitis (2-5). Particularly, nitric oxide (NO) contributes to the induction of systemic hypotension, vascular smooth muscle hyporeactivity, myocardial depression and oxidant stress that characterize septic shock (6). Although other isoforms of NOS can be up-regulated by lipopolysaccharide (LPS), it has been established that iNOS-mediated NO release plays a crucial role in the pathogenesis of septic shock. In endotoxemia iNOS is upregulated within the liver, specially in hepatocytes and Kupffer cells (7,8). The findings of liver iNOS induction in sepsis is also supported in humans. Elevated  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  levels are detected in the plasma of septic patients (9).

iNOS expression can be induced in rat and human hepatocytes after LPS and a proinflammatory cytokine mixture (CM) stimulation, including tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (10,11). In this regard, we have observed an iNOS-encoding gene up-regulation induced either by proinflammatory cytokines or the hepatitis B virus X protein in human hepatocyte-derived cell lines (5). The molecular basis for iNOS induction is only partially understood, and it is thought to be transcriptionally regulated by nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in several cell types including hepatocytes (12-14). The essential role of NF- $\kappa$ B in iNOS expression is also supported by reports determining that it is also required for the LPS-induced expression of iNOS in vivo (15).

NF- $\kappa$ B is a ubiquitous transcription factor and a pleiotropic regulator of several immune responses implicated in acute and chronic inflammation. It is found in the cytosol of numerous cell types as a trimeric complex, consisting of p65, p50 and inhibitor  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) subunits(16). The two major forms of I $\kappa$ B proteins, termed I $\kappa$ B  $\alpha$  and I $\kappa$ B  $\beta$ , can be inducibly phosphorylated, ubiquitinated and

subsequently degraded (17). The release of I $\kappa$ B from the trimer results in the nuclear import of the p50-p65 heterodimer where it binds to DNA. This process activates genes involved in the immune, inflammatory or acute phase responses, inducing the expression of cytokines, adhesion molecules, acute-phase proteins, immunoreceptors (16) and specific enzymes such as iNOS (11).

Liver methionine metabolism starts with the formation of S-adenosylmethionine (AdoMet), catalyzed by the enzyme methionine adenosyltransferase. AdoMet participates as the methyl donor for essentially all methylation reactions, provides the propylamine group for the synthesis of polyamines, and acts as a precursor for the synthesis of reduced glutathione (GSH) through the transsulfuration pathway (18). Methionine metabolism and the methylation cycle are altered in several liver disorders. Numerous studies have shown that the therapeutic administration of stable salts of AdoMet has favourable effects on liver disorders, including cholestasis, alcoholic and non-alcoholic cirrhosis and drug-induced hepatotoxicity (19-23). Due to the fact that it has been reported that AdoMet attenuates the in vivo LPS-induced expression of TNF- $\alpha$  (24), a proinflammatory cytokine implicated in the iNOS induction, and protects hepatocytes against the effect of cytokines (25), AdoMet could be considered as a potential candidate to modulate the iNOS expression. Hence, the aim of this study was to investigate the influence of AdoMet on LPS-mediated iNOS expression in vivo and in the CM-iNOS induction in cultured rat hepatocytes and human hepatocyte-derived cell lines

## **MATERIALS AND METHODS.**

### **MATERIALS.**

AdoMet, in the stable form of sulfate-p-toluensulfonate salt produced by Knoll Farmaceutici, Milan, Italy, was provided by Europharma (Madrid, Spain). All other reagents were of the best quality commercially available and otherwise stated they were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA)

### **METHODS.**

#### **ANIMAL EXPERIMENTS.**

The study was performed using albino Wistar rats (200-250 g) fed on a standard laboratory diet. Animals were divided into two experimental groups of 6 animals and two control groups of 4 animals. Animals received intraperitoneal injections and were starved during the time of experiment. One group received 15 mg/kg LPS (*Salmonella typhimurium*) dissolved in saline serum intraperitoneally (i.p.). A second group received the LPS dose plus AdoMet (two doses at 10 mg/Kg dissolved in saline serum and adjusted to pH 7.0 with NaOH; one 30 minutes before LPS administration and a second injection 3 hours later). As control a third group received the same dose of AdoMet without LPS treatment. The fourth group was injected with saline. Samples were collected 6 hours after to LPS treatment. To collect blood samples, the animals were anesthetized and a specimen was obtained by intracardiac puncture. Liver was removed and quickly freeze-clamped in liquid nitrogen and stored at -70°C until assayed. All animals were treated humanly, and study protocols were in compliance with the Universidad de Navarra's guidelines for the use of laboratory animals.

#### **ISOLATION , INCUBATION AND CYTOKINE INDUCTION OF RAT HEPATOCYTES.**

Hepatocytes were isolated from normally fed Wistar albino rats (250 g) by collagenase perfusion as previously described (26). Cells were plated onto 35-mm collagen-coated culture dishes at a density of  $1 \times 10^6$  cells per dish. Cultures were maintained in MEM medium (Gibco BRL, Grand Island, NY)

supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mmol/L glutamine, 50 mmol/L penicillin, and 50 mg/ml streptomycin sulfate. After a 90 minute incubation, the medium was removed, and cultures were refed in MEM medium supplemented with 2.5% fetal calf serum. To induce iNOS expression, cells were incubated with a mixture of 100 U/ml each of human recombinant IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  (CM) (Genzyme Corp. Boston, MA). To analyze the role of AdoMet on cytokine-induced iNOS expression, cells were pretreated or not with different AdoMet concentrations (0.1, 0.5, 1, 2 mM) 30 minutes prior to CM stimulation. The final AdoMet concentrations were achieved by dissolving AdoMet in MEM medium adjusted to pH 7.0 with NaOH.

#### **NORTHERN BLOT ANALYSIS.**

Total RNA was extracted from cultured cells using the ULTRASPEC<sup>R</sup> RNA isolation system (Biotecx Laboratories, Houston, Texas). Aliquots containing 15  $\mu$ g of RNA from each sample were run on 1% formaldehyde /agarose gels, transferred onto nitrocellulose membranes, and ultraviolet autocross-linked (UV Stratalinker 1800; Stratagene Inc., La Jolla, CA). Membranes were hybridized overnight at 42  $^{\circ}$ C with a 2.1 Kb <sup>32</sup>P-labeled probe from human iNOS cDNA (kindly provided by David A. Geller, Department of Surgery, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA). The hybridized filters were washed at 60  $^{\circ}$ C, and autoradiography was performed at -70 $^{\circ}$ C in the presence of intensifying screens, as previously described (5). Additionally, membranes were washed and rehybridized with a probe for  $\beta$ -actin to control for variations in the amounts of total RNA per lane.

#### **WESTERN BLOT ANALYSIS.**

To prepare protein extracts, tissue samples and cells were homogenized in RIPA Buffer (10 mM Tris HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1 % w/v SDS, 0.1 % v/v Triton X-100, 0.5% w/v sodium deoxycholate) containing 0.1 mM phenylmethylsulphonylfluoride, 1 $\mu$ g/ml aprotinin, and 5  $\mu$ g/ml pepstatin A. The cytosolic fraction was obtained by centrifugation at 13,000 g for 20 minutes at 4 $^{\circ}$ C. An equal volume of



2x SDS loading buffer (100 mM Tris HCl pH 6.8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0.02% bromophenol blue, 10% glycerol, 1%  $\beta$  mercaptoethanol) was added. Protein samples (10  $\mu$ g) were electrophoresed under reducing conditions on 12% SDS-PAGE gels, blotted onto nitrocellulose membranes (Amersham International, Little Chalfont, Bucks. UK), and probed with a polyclonal anti-iNOS, anti I $\kappa$ B-  $\alpha$ , anti I $\kappa$ B  $\beta$  (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and a polyclonal anti  $\beta$ -actin, all of them diluted at 1:1000, followed by a peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Blots were developed by enhanced chemiluminescence (Amersham International).

#### **PREPARATION OF NUCLEAR CELLS EXTRACTS AND ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY.**

Nuclear extracts were obtained from cells grown either untreated or pretreated with AdoMet for 30 minutes prior to addition of CM for 1 hour. Extractions were performed exactly as previously described (27). Binding reactions were performed using 3  $\mu$ g of nuclear proteins at 4°C in a volume of 18.5  $\mu$ l containing 10 mM HEPES pH 7.6, 10% glycerol, 50 mM KCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 2.5  $\mu$ g of poly (dI-dC), 0.75-1 ng of 3'-end-labeled probe. For competition, a 25 to 50-fold excess of unlabeled oligonucleotide was added to the reaction prior to the addition of the probe. The DNA-protein complexes were resolved by electrophoresis on 4 or 5 % polyacrylamide gels. The oligonucleotide (and their complementaries) sequences used were:

NF $\kappa$ BCON  $\Delta$ AGTTGAGGGGACTTTCCAGC;

NF $\kappa$ BMUT1  $\Delta$ AGTTGAGGCGACTTTCCAGC;

For supershift assays, 0,5  $\mu$ l of antibody was added 10 min prior to the labeled probe, using antibodies against the members of NF- $\kappa$ B family p-50, p-65, p-52, Rel-B and c-Rel (Santa Cruz Biotechnology).

## **CULTURE AND CYTOKINE INDUCTION OF HUMAN HEPATOCYTE-DERIVED CELL LINES.**

The human hepatoma derived cell line HepG2 was grown at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium, supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, and 50 µg/ml gentamycin. iNOS was induced in subconfluent cultures by the addition of CM (250 UI/ml each).

## **TRANSIENT TRANSFECTION AND LUCIFERASE ASSAY.**

HepG2 cells were plated 16 hours before transfection and transfected using FuGENE™ 6 transfection reagent (Boehringer Mannheim) with 0.5 µg of the reporter plasmid pGL3 NOS-8.3 (kindly provided by Dr. Joel Moss, National Institute of Health, Bethesda, MA) (14), containing the full-length hiNOS promoter cloned into the pGL3-basic luciferase reporter gen vector (Promega, Madison, WI), according to the manufacturer's guide. Cells were transfected at 50-70% confluence and after 36 hours the medium was replaced with fresh medium alone or containing different AdoMet concentrations. After 30 minutes of AdoMet pretreatment the CM was added. Cells were harvested 8 h later and luciferase activity was measured in a Lumat LB 9501 luminometer (Berthold, Wildbad, Germany). Transfection efficiency was determined by cotransfection of 0.25 µg of the plasmid pRL-Null and measuring Renilla luciferase activity using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) according to the manufacturer's guide.

## **RESULTS.**

### **IN VIVO EXPERIMENTS.**

#### **Effect of AdoMet on LPS-induced liver iNOS expression in rats.**

To determine whether AdoMet modulated the LPS- induced iNOS expression in the liver, rats were administered with LPS with or without AdoMet pretreatment and hepatic iNOS protein level was analyzed by Western blot. As shown in Fig 1 (Top) , iNOS protein was not detected in the liver from control animals injected with saline (lane 1) or AdoMet alone without LPS injection (lane 2). We found that LPS induced the expression of iNOS in the liver (lanes 3-5), 6 hours after its administration. Treatment of animals with 10 mg/Kg of AdoMet 30 minutes before injection of LPS and a second dosis 3 hours after LPS treatment resulted in a marked decrease in detectable levels of iNOS at the liver (lanes 6-8). Subsequent western blot analysis with a policlonal antibody against  $\beta$ -actin showed relative equal amounts of protein in all lanes (Figure 1. Bottom).

### **IN VITRO EXPERIMENTS.**

#### **Effect of AdoMet on iNOS expression in rat hepatocytes.**

To investigate the effects of AdoMet on iNOS messenger RNA (mRNA) and protein levels, rat hepatocytes were treated or not for 3 and 6 hours respectively with a combination of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  (CM; containing 100 UI/ml each). Additionally, where indicated, cells were preincubated with different AdoMet concentrations (0.1, 0.5, 1 and 2 mM) for 30 minutes prior to CM stimulation. In agreement with previous reports describing that the two-step collagenase method commonly employed in hepatocyte isolation induced hepatocyte iNOS expression (28), iNOS mRNA was detected in unstimulated hepatocytes (Figure 2. Panel A, lane 1) but it was undetectable when mRNA was immediately extracted after isolation (data not shown). iNOS mRNA was strongly induced after 3 hours of CM stimulation (lane 6). Interestingly, AdoMet addition resulted in a dose-dependent reduction in

To identify the NF- $\kappa$ B-binding factors, specific antibodies against NF- $\kappa$ B members were added to the binding reactions. As shown in Figure 3-Panel B antisera against p-52, Rel B or c-Rel (lanes 4-6) did not affect any DNA-binding complexes. In contrast antibodies against p-50, and p-65 (lanes 2-3) prevented the formation of the complexes.

#### **Effects of AdoMet on I $\kappa$ B protein levels.**

Nuclear translocation of the NF- $\kappa$ B/Rel complex is regulated by I $\kappa$ B. To analyze the NF- $\kappa$ B activation pathway affected by AdoMet, the degradation pattern of I $\kappa$ B  $\alpha$  and  $\beta$  was investigated by western blot. We tested whether the basal levels or the CM-induced degradation kinetics of I $\kappa$ B  $\alpha$  and I $\kappa$ B  $\beta$  were affected by AdoMet pretreatment. As shown in figure 4 (Top), pretreatment with 2mM AdoMet induced I $\kappa$ B  $\alpha$  synthesis in unstimulated hepatocytes (lane 1 vs lanes 2-5). Additionally, when hepatocytes were treated with the CM stimulated I $\kappa$ B  $\alpha$  signal completely disappeared 30 minutes after stimulation (lane 8). I $\kappa$ B $\alpha$  levels were progressively restored reaching basal levels 180 minutes after stimulation (lanes 10, 12,14 16). Interestingly, although AdoMet did not prevent I $\kappa$ B  $\alpha$  degradation (lane 9), AdoMet pretreatment was associated with a faster resynthesis of I $\kappa$ B  $\alpha$  protein (lanes 11,13,15,17) as compared with I $\kappa$ B  $\alpha$  levels in the absence of AdoMet. I $\kappa$ B  $\beta$  basal protein levels were not affected by AdoMet pretreatment (lane 1 vs lanes 2-5, bottom). Interestingly, although CM-stimulation slightly induced I $\kappa$ B  $\beta$  degradation, we observed that AdoMet exerted some protective effect on I $\kappa$ B  $\beta$  degradation promoted by CM (lanes 6, 8, 10, 12, 14, and 16 vs. 7,9,11,13,15, and 17).

#### **Effect of AdoMet on CM-induced iNOS promoter activation, mRNA and protein expression in human hepatocyte-derived cell lines.**

Finally, to further characterize the effects of AdoMet on the CM-mediated iNOS gene up-regulation, the human hepatocyte-derive cell line HepG2 was transiently transfected with the plasmid pGL3 NOS B.3, containing an 8.3 kB fragment of the human iNOS promoter fused to the luciferase gene. After transfection, cells were either pretreated or not with different concentrations of AdoMet for 30 minutes, prior to CM stimulation for 8 hours, and the promoter activity was analyzed. We observed an induction of the iNOS promoter activity in HepG2 cells (Figure 5. Panel A) after CM-stimulation (6.7 fold induction). Preincubation with AdoMet partially prevented the activation in a dose dependent manner. Interestingly, no effect of AdoMet was observed at the basal level. These data suggest that AdoMet inhibits iNOS gene transcription by suppressing the CM-induced iNOS promoter activation. The activity of the empty vector, pGL3 basic, was not affected by any stimuli (data not shown).

Furthermore, to analyze the effect of AdoMet in CM-mediated iNOS mRNA and protein induction, Hep G2 cells were either left unstimulated or stimulated for 4 or 24 hours with a CM. Additionally, cells were preincubated or not for 30 minutes prior to CM stimulation with different AdoMet concentrations (0.1, 0.5, 1 and 2 mM). In unstimulated HepG2 cells, iNOS mRNA (Figure 5. Panel B) and protein (Figure 5. Panel C) were undetectable but they were induced after CM stimulation, as shown by northern and western blot analysis. A dose-dependent reduction was observed in iNOS mRNA and protein levels when cells were preincubated with AdoMet. Subsequent probing for  $\beta$ -Actin showed relatively equal amounts of RNA and protein in all lines.

## DISCUSSION.

The rationale to investigate the influence of AdoMet on iNOS expression was based on two facts, firstly the role that NO appeared to play in both physiological and physiopathological processes through iNOS activity, exerting regulatory protective and deleterious biological effects (30,31), and secondly the beneficial clinical effects exerted by AdoMet in liver diseases (18). Different approaches have been directed to elucidate the role of NO during sepsis in the liver and other organs, and both beneficial and detrimental NO-mediated effects have been described. In animal experimental models of endotoxemia, it has been shown that non-specific inhibition of NOS enzymes results in increased liver damage, supporting a beneficial role of NO in the liver during sepsis (7, 32); however, the use of selective iNOS inhibitors reduced LPS-induced damage in rat liver (33), preserving intracellular GSH and reducing lipid peroxidation (34). Although AdoMet was able to reduce the LPS-mediated liver iNOS induction, our results indicate that AdoMet does not inhibit iNOS expression completely at the therapeutic concentrations selected, and that this inhibition could be organ-specific. However, the partial and tissue-specific suppression of iNOS may be sufficient to modulate several responses associated with NO production.

Additionally, AdoMet partially inhibited the CM-mediated mRNA and protein iNOS induction in both rat hepatocytes and human hepatocyte-derived cell lines. In vitro experiments showed that this inhibition of iNOS expression was dose-dependent and that the maximal inhibitory response occurred at concentrations of 2 mM. The mechanisms through AdoMet regulate iNOS expression are not totally understood. Transient transfection experiments, using plasmids containing the promoter region of the human iNOS gene in human hepatocyte derived cell lines, indicated that the AdoMet inhibitory effect could be mediated, at least partially, through the transcriptional control of the iNOS gene. Furthermore, we showed that the DNA-binding capacity of the transcription factor NF- $\kappa$ B, a central mediator of the inflammatory response and directly involved in CM-mediated iNOS induction, was partially inhibited

by AdoMet in rat hepatocytes. Although the mechanism of NF- $\kappa$ B activation is not fully known, the degradation and dissociation of the inhibitory subunits appear to be the key events in the release of the NF- $\kappa$ B complexes (16,17). The onset of NF- $\kappa$ B activation after CM treatment consists of a rapid reduction of I $\kappa$ B  $\alpha$  levels followed by a gradual reappearance. Pretreatment of cells with AdoMet accelerated this process of resynthesis; additionally, AdoMet increased I $\kappa$ B  $\alpha$  levels in unstimulated cells. Interestingly, AdoMet was able to increase the amounts of I $\kappa$ B  $\beta$ , another member of the I $\kappa$ B family, after CM-stimulation. Our results indicated that AdoMet interferes with NF- $\kappa$ B activity, at least in part, by promoting I $\kappa$ B  $\alpha$  synthesis and a faster resynthesis of I $\kappa$ B  $\alpha$  and I $\kappa$ B  $\beta$  after CM-stimulation.

AdoMet is the main methylating agent in transmethylation reactions involved in key physiological events, such as the control of membrane fluidity, transport of metabolites, transmission of signals across the membrane and gene expression (35,36). Additionally, one important property of AdoMet is to provide a source of cysteine for the production of GSH, which is a major natural endogenous hepatoprotective agent and the predominant low molecular antioxidant. In fact, AdoMet has been specifically shown to increase mitochondrial GSH content in cultured hepatocytes from ethanol-fed rats (37), and also AdoMet treatment increased GSH levels in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease (38). It has been demonstrated that hepatocyte iNOS is regulated by glutathione (39) and that NO modulates the hepatocyte GSH synthesis (40). Several findings suggest that reactive oxygen species regulate NF- $\kappa$ B activation as almost all NF- $\kappa$ B activators are sensitive to inhibition by antioxidants (41,42). Furthermore, it has been shown that reactive oxygen intermediates regulate iNOS expression and that iNOS gene transcription is regulated by a signal transduction pathway sensitive to antioxidants (43, 44). AdoMet is able to behave in vitro as a scavenger of hydroxyl radicals and chelates iron ions to inhibit hydroxyl radicals generation (45), both intermediates involved on iNOS induction. These data suggest that AdoMet could modulate the iNOS expression and NF- $\kappa$ B activation through a methylation

reaction, by promoting changes in the intracellular GSH pools and/or preventing oxygen radical generation. Ongoing experiments in our lab will help to corroborate these issues.

Additionally, it has been observed that the increased NO production in the liver during septic shock (46) or hypoxia (47) is associated with the inactivation of the hepatic methionine adenosyltransferase, the enzyme that synthesizes AdoMet, by S-nitrosylation (48), and that physiological amounts of GSH reverse the action of NO (49). Thus, AdoMet could be considered as a potential therapeutic agent for liver injury, of different etiologies, due to its antioxidant effect through the GSH synthesis, its capacity to inhibit oxygen radicals generation and its ability to inhibit NO synthesis restoring methionine-adenosyltransferase activity.

AdoMet has a protective effect both in vivo and in vitro on liver cell damage induced by a number of hepatotoxic agents, such as acetaminophen (19), carbon tetrachloride (20), ethanol (21), bromobenzene, D-galactosamine (22), and cytokines (25). Although the mechanism by which AdoMet exerts its protective actions is still unclear, in recent years it has become apparent that it is capable of providing direct effects at the cellular, subcellular and molecular levels, in hepatocytes as well as in cells of nonhepatic origin. AdoMet interacts with cellular membranes and it can be uptaken by isolated hepatocytes (50), exerting a protective effect against agents that promote cellular injury. We have recently demonstrated the existence of an increased hepatocellular iNOS expression and the accumulation of intrahepatic amounts of nitrotyrosine in chronic viral hepatitis (5, 51). The toxicity of NO is thought to be engendered, at least in part, by its reaction with superoxide to yield peroxynitrite (52), a potent oxidant that promotes the formation of nitrotyrosine within the cells and tissue lesions (53, 54). Interestingly, nitrotyrosine accumulation within the liver was positively correlated with the severity of liver damage (51). The capacity of AdoMet to modulate iNOS suggests that its administration could be considered as a therapeutical approach to prevent the nitrotyrosine formation, but whether AdoMet



inhibits nitrotyrosine through down-regulation of iNOS expression or other mechanisms deserves further studies.

Finally, it has been reported that AdoMet is able to down-regulate the expression of TNF- $\alpha$  in vitro, and attenuates the LPS-induced expression in vivo (24). TNF- $\alpha$  is a pleiotropic cytokine implicated in the pathogenesis of inflammatory processes which are mediated, at least partially, by NF- $\kappa$ B activation and iNOS up-regulation. Additionally, we have determined that AdoMet was able to modify the NF- $\kappa$ B activation. NF- $\kappa$ B activation and the subsequent transcriptional activation of cytokines, adhesion molecules and enzymes are important events in the initiation and perpetuation of tissue inflammation. Thus, the control of NF- $\kappa$ B has been suggested as a therapeutic target in several diseases, such as pancreatitis, septic shock and glomerulonephritis (55, 56). Whether the control of NF- $\kappa$ B activation mediated by AdoMet is operative in vivo remains to be determined; however, the capacity of AdoMet to control NF- $\kappa$ B activity and TNF- $\alpha$  production suggests that AdoMet could be considered as a useful therapeutic agent for treatment of pathological conditions involving these factors.

In conclusion, AdoMet inhibits the in vivo LPS-induced iNOS expression within the liver in rats and the CM-iNOS gene induction in rat hepatocytes and in human hepatocyte-derived cell lines. Whether this reduction in iNOS expression could be beneficial for the treatment of patients with chronic liver disease warrants more extensive clinical studies.

## ACKNOWLEDGEMENTS.

We are very grateful to Dr. D.A. Geller and Dr. J. Moss for providing critical reagents. We would also like to thank Dr. Manuel López-Cabrera and Dr. Enrique Lara for critical readings of the manuscript and helpful suggestions. The expert English technical assistance of Brenda Ashley and the secretary help of Rocha Barroso are gratefully acknowledged.

## REFERENCES.

1. Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 1993; 54: 171-178.
2. Hierholzer C, Harbrecht B, Menezes JM, Kane J, MacMicking J, Nathan CF, Peitzman A, et al. Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. *J Exp Med* 1998; 187: 917-928.
3. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1993; 178: 749-754.
4. Middleton SJ, Shorthouse M, and Hunter JO. Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. *Lancet* 1993; 341: 465-466.
5. Majano PL, Garcia-Monzón C, López-Cabrera M, Lara-Pezzi E, Fernández-Ruiz E, García-Iglesias C, Borque MJ, Moreno-Otero R. Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis. Evidence for a virus-induced upregulation. *J Clin Invest* 1998; 101: 1343-1352.
6. Vincent JL, Zhang H, Szabo C, Preiser JC. Effect of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1781-1785.
7. Billiar TR, Curran RD, Harbrecht BG, Stuehr DJ, Demetris AJ, Simmons RL. Modulation of nitric oxide synthase in vivo: NG-monomethyl-L-arginine inhibits endotoxin-induced nitrite/nitrate biosynthesis while promoting hepatic damage. *J Leukoc Biol* 1990; 48: 565-569.
8. Laskin DL, Rodriguez del Valle M, Heck DE, Hwang SM, Ohnishi ST, Durham SK, Goller NL, et al. Hepatic nitric oxide production following acute endotoxemia in rats is mediated by increased nitric oxide synthase gene expression. *HEPATOLOGY* 1995; 22: 223-234.
9. Ochoa JB, Udekwu AO, Billiar TR, Curran RD, Cerra FB, Simmons RL, Peitzman AB. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg* 1991; 214: 621-626.
10. Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, Hofmann K, Simmons RL. Hepatocytes produce nitrogen oxide from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J Exp Med* 1989; 170: 1769-1774.
11. Nussler AK, Di Silvio M, Billiar TR, Hoffman RA, Geller DA, Selby R, Madariaga J, et al. Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J Exp Med* 1992; 176: 261-264.
12. Xie QW, Kashiwaba Y, Nathan C. Role of transcription factor NF- $\kappa$ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1994; 269:4705-4708.
13. Taylor BS, de Vera ME, Ganster RW, Wang Q, Shapiro RA, Morris SM, Billiar T, et al. Multiple NF- $\kappa$ B enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide gene. *J Biol Chem* 1998; 273: 15148-15156.

14. Marks-Konczalik J, Chu SC, Moss J. Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor-kappaB-binding sites. *J Biol Chem* 1998; 273: 22201-22208.
15. Liu SF, Ye X, Malik AB. In vivo inhibition of nuclear factor-kB activation prevents inducible nitric oxide synthase expression and systemic hypotension in a rat model of septic shock. *J Immunol* 1997; 159: 3976-3983.
16. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappaB in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 141-179.
17. Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-683.
18. Mato JM, Alvarez L, Ortiz P, Pajares MA. S-adenosylmethionine synthesis: Molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacol Ther* 1997; 73: 265-280.
19. Bray GP, Tredger M, Williams R. S-Adenosylmethionine protects against acetaminophen hepatotoxicity in two mouse models. *HEPATOLOGY* 1992; 15: 297-301.
20. Corrales F, Giménez A, Alvarez L, Caballería J, Pajares MA, Andreu H, Parés A, et al. S-Adenosylmethionine treatment prevents CCl<sub>4</sub>-induced S-adenosylmethionine synthetase inactivation and attenuates liver injury. *HEPATOLOGY* 1992; 16: 1022-1027.
21. Lieber CS, Casini A, De Carli LM, Kim C, Lowe N, Sasaki R, Leo MA. S-Adenosyl-L-methionine attenuates alcohol-induced liver injury in the baboon. *HEPATOLOGY* 1990; 11: 165-172.
22. Wu J, Söderbergh H, Karlsson K, Danielsson A. Protective effect of S-adenosyl-L-methionine on bromobenzene- and D-galactosamine-induced toxicity to isolated rat hepatocytes. *HEPATOLOGY* 1996; 23: 359-365.
23. Mato JM, Cámara J, Fernández de Paz J, Caballería L, Coll S, Caballero A, García-Buey L, et al. S-adenosylmethionine in alcoholic liver cirrhosis: a randomized, placebo-controlled, double-blind, multicenter clinical trial. *J Hepatol* 1999; 30: 1081-1089.
24. Watson WH, Zhao Y, Chawla RK. S-adenosylmethionine attenuates the lipopolysaccharide-induced expression of the gene for tumour necrosis factor  $\alpha$ . *Biochem J* 1999; 342: 21-25.
25. Arias-Díaz J, Vara E, García C, Villa N, Rodríguez JM, Ortiz P, Balibrea JL. S-adenosylmethionine protects hepatocytes against the effects of cytokines. *J Surg Res* 1996; 62: 79-84.
26. Castaño JG, Alemany S, Nieto A, Mato JM. Activation of phospholipid methyltransferase by glucagon in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1980; 255: 9041-9043.
27. Lara-Pezzi E, Armesilla AL, Majano PL, Redondo JM, López-Cabrea. The hepatitis B virus X protein activates nuclear factor of activated T cells (NF-AT) by a cyclosporin A-sensitive pathway. *EMBO J* 1998; 17: 7066-7077.
28. Wang H, Gao X, Fukumoto S, Tademoto S, Sato K, Hirai K. Post-isolation inducible nitric oxide synthase expression due to collagenase buffer perfusion and characterization of the gene regulation in primary cultured murine hepatocytes. *J Biochem (Tokyo)* 1998; 124: 892-899.
29. Rodríguez-Ariza A, Paine AJ. Rapid induction of NF-kB binding during liver cell isolation and culture: Inhibition by L-NAME indicates a role of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 145-148.
30. Clemens MG. Nitric Oxide in liver injury. *HEPATOLOGY* 1999; 30: 1-5.
31. Jianrong L, Billiar TR. Nitric Oxide IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am J Physiol* 1999; 276: G1069-G1073.
32. Harbrecht BG, Billiar TR, Stadler J, Demetris AJ, Ochoa J, Curran RD, Simmons RL. Inhibition of nitric oxide synthesis during endotoxemia promotes intrahepatic thrombosis and an oxygen-radical mediated hepatic injury. *J Leukoc Biol* 1992; 52: 390-394.

- 33 Szabo C, Southan GJ, Thiemermann C. Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiourea sulfate, a potent selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12472-12476.
34. Zhang C, Walker LM, Hinson JA, Mayeux PR. Oxidant stress in rat liver after lipopolysaccharide administration: Effect of inducible nitric-oxide synthase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293: 968-972.
35. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP. S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J* 1996;10: 471-480.
36. Garcia-Trevijano E, Latasa MU, Carretero MV, Berasain C, Mato JM, Avila MA. S-adenosylmethionine regulates MAT1A and MAT2A gene expression in cultured rat hepatocytes: a new role for S-adenosylmethionine in the maintenance of the differentiated status of the liver. *FASEB J* 2000; 14:2511-2518.
37. Collet A, Garcia-Ruiz C, Miranda M, Ardite E, Mari M, Morales A, Corrales F, et al. Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes hepatocytes to tumor necrosis factor. *Gastroenterology* 1998; 115: 1541-1551.
38. Vendemiale G, Altomare E, Trizio T, Le Grazie C, Di Padova C, Salemo MT, Carrieri V. Effect of oral S-adenosyl-L-methionine on hepatic glutathione in patients with liver disease. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24: 407-415.
39. Harbrecht BG, Di Silvio M, Chough V, Kim YM, Simmons RL, Billiar TR. Glutathione regulates nitric oxide synthase in cultures hepatocytes. *Ann Surg* 1997; 225: 76-87.
40. Kuo PC, Abe KY. Nitric oxide-associated regulation of hepatocyte glutathione synthesis is a guanylyl cyclase-independent event. *Surgery* 1996; 120: 309-314.
41. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of NF-kappaB transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991;10:2247-2258.
42. Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear Factor-kappaB: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun* 1992; 17:221-237.
43. Duval DL, Miller DR, Collier J, Billings RE. Characterization of hepatic nitric oxide synthase: Identification as the cytokine-inducible form primarily regulated by oxidants. *Mol Pharmacol* 1996; 50: 277-284.
44. Kuo PC, Abe KY, Schroeder RA. Oxidative stress increases hepatocyte iNOS gene transcription and promoter activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234: 289-292.
45. Evans PJ, Whiteman M, Tredger JM, Halliwell B. Antioxidant properties of S-adenosyl-L-methionine: A proposed addition to organ storage fluids. *Free Radic Biol Med* 1997; 23:1002-1008.
46. Avila MA, Mingorance J, Martinez-Chantar ML, Casado M, Martin-Sanz P, Boscá L, Mato JM. Regulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase during septic shock: role of nitric oxide. *HEPATOLOGY* 1997;25:391-396.
47. Avila MA, Carretero MV, Rodriguez EN, Mato JM. Regulation by hypoxia of methionine adenosyltransferase activity and gene expression in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1998; 114: 364-371.
48. Ruiz F, Corrales FJ, Miqueo C, Mato JM. Nitric oxide inactivates rat hepatic methionine adenosyltransferase *in vivo* by S-nitrosylation. *HEPATOLOGY* 1998;28:1051-1057.
49. Corrales FJ, Ruiz F, Mato JM. *In vivo* regulation by glutathione of methionine adenosyltransferase S-nitrosylation in rat liver. *J Hepatol* 1999; 31: 887-894.
50. Traver J, Varela I, Mato JM. Effect of exogenous S-adenosylmethionine on phosphatidyl choline synthesis by isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 1984; 33: 1562-1564.

51. Garcia-Monzón C, Majano PL, Zubia I, Sanz P, Apolinario A, Moreno Otero R. Intrahepatic accumulation of nitrotyrosine in chronic viral hepatitis associates with histological severity of liver disease. *J Hepatology* 2000;32: 331-338.
52. Beckman JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol*. 1996; 9: 836-844.
53. Singer II, Kawka DW, Scott S, Weidner JR, Mumford RA, Riehl TE, Stevenson WF. Expression of nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1996;111: 871-885
54. Haddad YI, Ischiropoulos H, Holm BA, Beckman JS, Baker JR, Matalon S. Mechanism of peroxynitrite-induced injury to pulmonary surfactants. *Am J Physiol* 1993;265: L555-564.
55. Sakurai H, Hisada Y, Ueno M, Sugiura M, Kawashima K, Sugita T. Activation of transcription factor NF-kappaB in experimental glomerulonephritis in rats. *Biochim Biophys Acta* 1996;1316:132-138.
56. Steinle AU, Weidenbach H, Wagner M, Adler G, Schmid RM. NF-kappaB/Rel activation in cerulein pancreatitis. *Gastroenterology* 1999; 116:420-430.

**FIGURE LEGENDS.****FIGURE 1. Effect of AdoMet on LPS-induced iNOS protein induction in the liver.**

Rats were injected with LPS (10 mg/Kg) i.p. and LPS plus AdoMet (10 mg/kg; two injections, one 30 minutes prior to LPS treatment and a second 3 hours after LPS treatment). As controls, rats were treated with AdoMet alone (lane 2) or saline (lane 1). **Top.** Western blot analysis of iNOS protein in the liver after 6 hours of LPS treatment. **Bottom.** Western blot analysis of  $\beta$ -actin showed relative equal amounts of protein in all lines. This experiment is representative of two separate experiments, performed using three animals in LPS and LPS plus AdoMet groups, and two animals in each control group.

**FIGURE 2. Effect of AdoMet on CM-induced iNOS induction in rat hepatocytes.**

Hepatocytes were either treated or not with a CM (containing TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IFN- $\gamma$ , 100 UI/ml each). Additionally, cells were pretreated or not with different AdoMet concentrations (0.1, 0.5, 1 and 2 mM) 30 minutes prior to the CM-stimulation. **Panel A.** Northern blot analysis of iNOS mRNA 3 hours after CM-stimulation (top). Subsequent analysis of  $\beta$ -actin mRNA showed relative equal amounts of RNA in all lines (bottom). **Panel B.** Western blot analysis of iNOS protein 6 hours after CM-stimulation. (top). Analysis of  $\beta$ -actin levels showed relative equal amounts of protein in all lines (bottom). Results shown are representative of three independent experiments performed with RNA and protein isolated from different cell samples.

**Figure 3. Effect of AdoMet on CM-induced formation of NF- $\kappa$ B containing DNA-binding complexes.**

Nuclear extracts were obtained from rat hepatocytes either treated or not with a CM (containing TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IFN- $\gamma$ , 100 UI/ml each) for 1 hour. Additionally, cells were pretreated or not with different AdoMet concentrations (1 and 2 mM) 30 minutes prior to the CM-stimulation. **Panel A.** Two  $\mu$ g

aliquots of unstimulated and CM-stimulated rat hepatocyte nuclear extracts were incubated with a <sup>32</sup>P-labeled probe containing a consensus NF-κB binding site. For competition studies, a 50-fold molar excess of an oligonucleotide containing a mutated NF-κB binding site and a 25- and 50- fold molar excess of the consensus NF-κB oligonucleotide were used. Panel B. Prior to addition of the NF-κB consensus probe to CM-stimulated nuclear extracts, 0,5 μl of preimmune or polyclonal antibodies specific for different members of the NF-κB family were included in the binding reactions. Results shown are representative of three independent experiments performed with nuclear extracts isolated from different cell samples and yielded similar results.

#### **Figure 4. Effect of AdoMet on IκB protein levels.**

Rat hepatocytes were either pretreated or not with 2 mM AdoMet for 30 minutes prior to CM-stimulation. Cells were harvested at the indicated time points after CM-stimulation and total protein extracts were analyzed by Western blotting using antibodies against IκB α (top) and IκB β (bottom). Results shown are representative of three independent experiments performed with protein extracts isolated from different cell samples and yielded similar results.

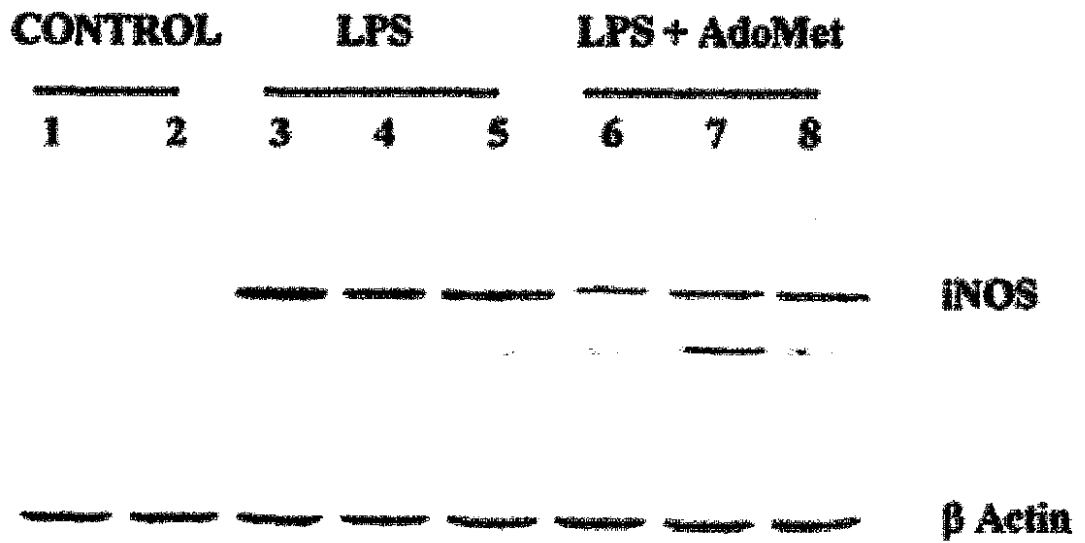
#### **Figure 5. Effect of AdoMet on both CM-induced iNOS promoter activation and CM-mediated iNOS induction in HepG2 cells.**

**Panel A.** Analysis of hiNOS promoter activity. The iNOS promoter-based luciferase plasmid, pGLNOS 8.3, was used to transfect HepG2 cells. After transfection, cells were treated or not with a CM for 8 hours. Additionally, hepatocytes were either pretreated or not with different AdoMet concentrations. The luciferase activities are represented as fold induction over the expression of pGLNOS 8.3 in the absence of CM-stimulation and AdoMet pretreatment. Transfection efficiency was determined by cotransfection of 0.25 μg of the plasmid pRL-Null and measuring Renilla luciferase activity using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) according to the manufacturer's guide. Results

shown are representative of four independent experiments. **Panel B.** Northern blot analysis of iNOS mRNA 3 hours after CM-stimulation (top). Subsequent analysis of  $\beta$ -actin mRNA showed relative equal amounts of RNA in all lanes (bottom). **Panel C.** Western blot analysis of iNOS protein 24 hours after CM-stimulation (top). Analysis of  $\beta$ -actin protein levels showed relative equal amounts of protein in all lanes (bottom). Northern and western blot results shown are representative of three independent experiments performed with protein and RNA isolated from different cell samples.

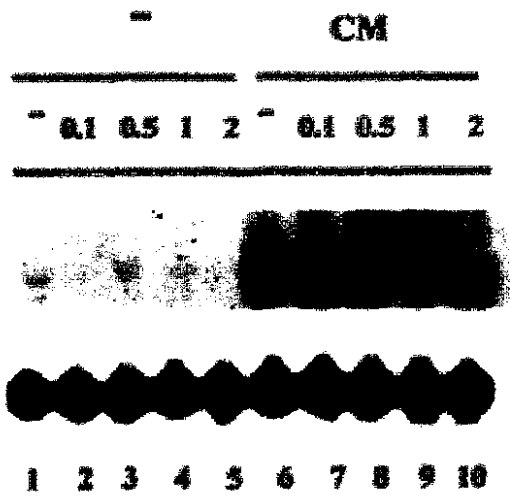


# FIGURE 1

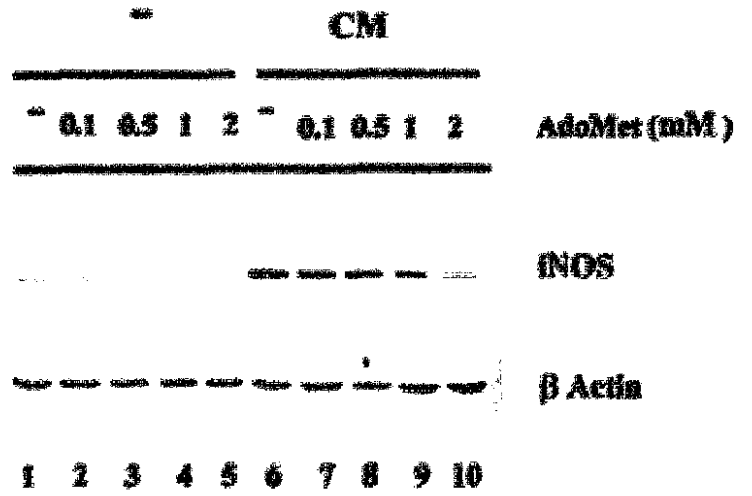


# FIGURE 2

## PANEL A

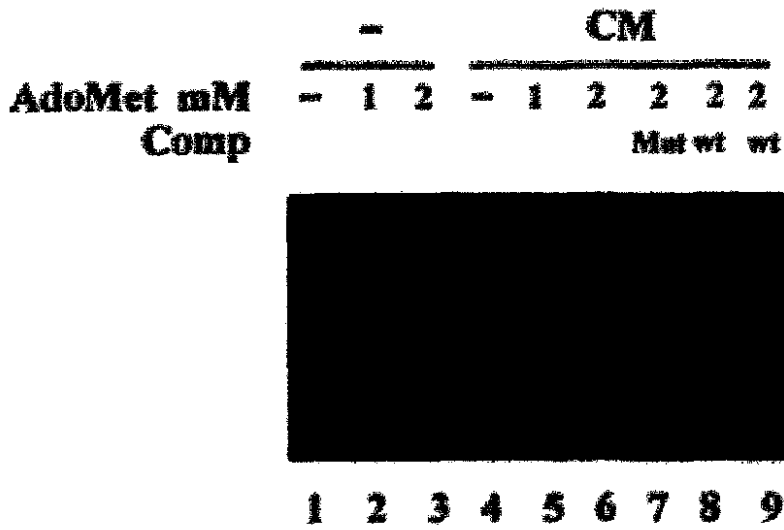


## PANEL B

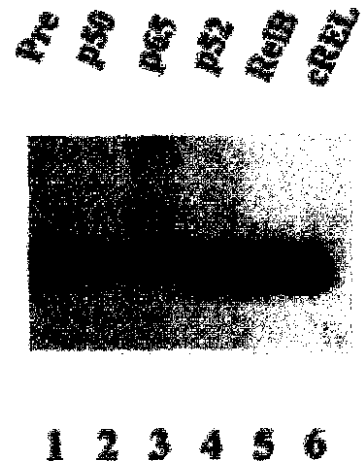


# FIGURE 3

## PANEL A



## PANEL B



# FIGURE 4

					<u>15</u>		<u>30</u>		<u>45</u>		<u>60</u>		<u>120</u>		<u>180</u>		Time (minutes)		
-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	CM
-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	AdoMet (mM)
																	Iκ Bα		
																	Iκ Bβ		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17			

**FIGURE 5**

