



Universidad Autónoma de Madrid
Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

**Papel de prostaglandina E₂ dependiente de
ciclooxigenasa-2 en el desarrollo de la
esteatohepatitis no alcohólica y la fibrosis
hepática. Implicación de miR-23a-5p y miR-
28a-5p**

Rocío Brea Contreras

Madrid, 2018

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina



Universidad Autónoma de Madrid



**Papel de prostaglandina E₂ dependiente de ciclooxigenasa-2
en el desarrollo de la esteatohepatitis no alcohólica y la
fibrosis hepática. Implicación de miR-23a-5p y miR-28a-5p**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por:

Rocío Brea Contreras

Madrid, 2018

Graduada en Biología, para optar al grado de Doctora
por la Universidad Autónoma de Madrid

Dirigida por:

Dra. Paloma Martín Sanz

Dra. Noelia Agra Andrieu

Realizada en:

Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols CSIC-UAM





La directora **Dra. Paloma Martín Sanz** y la codirectora **Dra. Noelia Agra Andrieu** certifican que **Rocío Brea Contreras**, graduada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado el trabajo de investigación titulado: “**Papel de prostaglandina E₂ dependiente de ciclooxygenasa-2 en el desarrollo de la esteatohepatitis no alcohólica y la fibrosis hepática. Implicación de miR-23a-5p y miR-28a-5p**” bajo su dirección en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Revisado el presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo considerando que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente.

Firmado, para que conste a todos los efectos, en Madrid, a _ de _ de 2017.

Fdo. **Paloma Martín Sanz**
Directora de Tesis
Investigadora Científica, CSIC

Fdo. **Noelia Agra Andrieu**
Codirectora de Tesis
Investigadora Contratada, INGEMM

V^oB^o Tutor
Lisardo Boscá Gomar
Investigador Científico, CSIC



Esta memoria de tesis ha sido realizada con ayuda de la Beca Formación de Personal Investigador (FPI) con referencia BES-2014-070811 en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols CSIC-UAM.

A mis padres, Julia y Antonio

A Alex

A Paloma y Noelia

Agradecimientos

Ha sido un largo camino para llegar hasta este momento, y no puedo evitar recordar a toda la gente que me ha acompañado a lo largo del mismo. Sin ellos no estaría aquí ahora, muchas gracias a todos:

En primer lugar, quiero agradecer a toda mi familia el apoyo constante que me han proporcionado. Hay muchas personas que nombrar, pero quiero hacer especial mención a mis padres, Julia y Antonio. Os quiero, y gracias de corazón por estar conmigo día a día y animarme a cada paso, en los momentos buenos y en los malos.

A Paloma, mi directora, muchas gracias por darme la oportunidad de realizar este trabajo en tu laboratorio y bajo tu tutela. El esfuerzo ha sido grande, pero ha merecido la pena, pues ha sido una gran experiencia y he podido aprender un montón de cosas que de seguro me servirán para el futuro.

Noelia, mi codirectora, te agradezco tu enorme ayuda y que me hayas enseñado tantas cosas día a día a lo largo de todo este tiempo, no solo respecto a las técnicas, sino también a pensar. Y bendita sea tu infinita paciencia con mis constantes preguntas. Eres una gran amiga y me alegra haber contado con tu apoyo durante estos años.

Lisardo, gracias por aceptar ser mi tutor en este trabajo, y sobre todo por tu apoyo constante en los proyectos y en el día a día en el laboratorio, siempre tienes palabras amables para todos.

Agradezco a Daniel y a Omar todo el apoyo prestado, sin vosotros tampoco habría sido posible llegar hasta aquí. Gracias por enseñarme nuevas técnicas y responder a todas mis dudas; sin olvidar la locura de los Western Blot. Infinitas gracias por aquello.

A mis amig@s (Vero, Patri, Natalia, Rafa, María, Almu). No solo me habéis enseñado muchas cosas, sino que siempre habéis estado ahí, para lo bueno y lo malo. Sois tod@s grandes personas y me alegro mucho de haberos conocido. No cambiéis nunca.

Al resto de compañer@s del B11 (Marina, César, Marta, Silvia), me alegra haber podido trabajar con todos vosotros. Gracias por acompañarme en la experiencia y en el trabajo día a día a lo largo de estos años. A aquell@s que acabáis de llegar (Victoria, Adrián), espero que podamos conocernos mejor, y que la experiencia futura sea igual de buena o incluso mejor que la poca que hemos tenido hasta el momento.

También quiero agradecer todo el trabajo realizado por el grupo de Marta Casado (Valencia), el grupo de Carmelo García Monzón (Hospital Universitario Santa Cristina), el grupo de Laura García Bermejo (Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, IRICYS), el servicio de genómica, microscopía y animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (IIB), los servicios de citometría de flujo e

histología del IIB y el Centro Nacional de Biotecnología (CNB) y el servicio de microscopía confocal de la UAM. La completa realización de este trabajo no hubiera sido posible sin la gran ayuda de todos ellos.

Agradezco enormemente a Bernd por permitirme realizar la estancia en su laboratorio, en la University of California San Diego (UCSD). No solo he aprendido mucho con esta experiencia, sino que todos (Tim, Yanhan, Sena, Jinling, Yi, Huikuan, Kate, Weizhong) me habéis tratado muy bien y como a una más desde el inicio. Sobre todo, Cristina, gracias por hacerte cargo de mí durante estos cuatro meses y enseñarme tantas cosas.

(I greatly appreciate Bernd for allowing me to stay in his laboratory, in UCSD. Not only I have learned a lot from this experience, but everyone (Tim, Yanhan, Sena, Jinling, Yi, Huikuan, Kate, Weizhong) has treated me very well and as one more from the beginning. Above all, Cristina, thank you for taking care of me during these four months and teaching me so many things).

Y cómo olvidar a mis “Espantaos” (Carmen, Diego, Lidia, Natalia, Yoli). La de momentos que habremos pasado juntos, y no solo en la carrera. Parece mentira que incluso a pesar de la distancia da la sensación de que seguimos todos en el mismo lugar. Gracias a todos por estar ahí cuando lo he necesitado.

Irene, mi compi del máster, no sabes lo que me alegra que sigamos en contacto, apoyándonos mutuamente con nuestras penas y glorias. Te deseo todo lo mejor y muchos ánimos, que a ti tampoco te queda nada ya para terminar.

Y Natalia y Annaïs, mis amigas de toda la vida. Agradezco enormemente que sigamos viéndonos después de tanto tiempo. Aunque estemos cada una liadas con cosas totalmente diferentes, siempre terminamos por encontrar un hueco. Gracias chicas por ser como sois, y por seguir ahí tras tantos años ya.

Finalmente, Alex. ¿Qué puedo decir que no haya dicho ya? Eres la persona que más quiero y agradezco infinitamente tenerte a mi lado. Gracias por mantenerme a flote cuando lo he pasado mal, y por compartir las alegrías cuando han venido. No dudo que en el futuro seguirás ahí y que todos los momentos que nos quedan por vivir serán igual de buenos o incluso mejores que los que ya hemos pasado.

Gracias a todos.

Resumen / Abstract

Ciclooxigenasa (COX)-2 es la enzima que cataliza la reacción limitante en la biosíntesis de prostanoideos, siendo prostaglandina E₂ (PGE₂) el metabolito generado más abundante. Su expresión se ha detectado en esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y en fibrosis hepática. Sin embargo, el papel que presenta en el desarrollo y progresión de estas enfermedades es muy controvertido. Para analizarlo, se ha utilizado un modelo de ratón transgénico (Tg), portador del gen COX-2 humano en el hepatocito (hCOX-2-Tg). A estos animales se les ha tratado con una dieta deficiente en metionina y colina (MCD) para inducir EHNA, se les ha sometido a una ligación del conducto biliar común (BDL) o a un tratamiento con tetracloruro de carbono (CCl₄) para inducir fibrosis hepática. Por otro lado, microARNs (miARNs, miR) son pequeñas moléculas de ARN (ácido ribonucleico) monocatenario no codificante, cuya función consiste en regular la expresión génica a nivel post-transcripcional. Dada su relevancia en las enfermedades hepáticas crónicas, se ha analizado el patrón de expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p, y su relación con PGE₂, en la fibrosis hepática. Como resultado, se ha observado que PGE₂ dependiente de COX-2 presenta un papel protector frente al desarrollo de EHNA y fibrosis hepática en modelos murinos, dado su papel anti-inflamatorio, anti-apoptótico y anti-oxidante; y la inhibición de la activación de las células esteladas hepáticas (HSC) tanto *in vivo* como *in vitro*. Respecto a su papel protector en la fibrosis hepática, los resultados sugieren que PGE₂ actúa de dos formas: inhibiendo la apoptosis de los hepatocitos, y disminuyendo la expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p en las HSC, lo que reduce la proliferación y aumenta la apoptosis en estas células. Por último, se ha analizado la expresión hepática de COX-2, así como los niveles de PGE₂ y miARNs en suero de pacientes con EHNA o fibrosis hepática. Se ha observado una inducción de la expresión de COX-2 y PGE₂ endógena como parte de un mecanismo de defensa en respuesta al daño hepático.

Ciclooxigenase (COX)-2 is the enzyme that catalyzes the limiting reaction in prostanoids biosynthesis, being prostaglandin E₂ (PGE₂) the most abundant metabolite generated. COX-2 expression has been detected in non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis, however, its role in the development and progression of these diseases is highly controversial. To analyze this, a transgenic mouse model (Tg), carrying the human COX-2 gene in the hepatocyte (hCOX-2-Tg) was used. These animals have been treated with a methionine and choline deficient diet (MCD) to induce NASH, have been subjected to a bile duct ligation (BDL) or to a treatment with carbon tetrachloride (CCl₄) to induce liver fibrosis. On the other hand, miRNAs are small non-coding single-stranded RNA molecules whose function is to regulate gene expression at post-transcriptional level. Due to its relevance in chronic liver diseases, the expression pattern of miR-23a-5p and miR-28a-5p, and its relationship with PGE₂ in liver fibrosis, has been analyzed. As a result, COX-2-dependent PGE₂ has been shown to play a protective role against the development of NASH and liver fibrosis in murine models, given its anti-inflammatory, anti-apoptotic and anti-oxidant role; and the inhibition of hepatic stellate cells (HSC) activation both *in vivo* and *in vitro*. Regarding its protective role in liver fibrosis, the results suggest that PGE₂ acts by two ways: by inhibiting the hepatocytes apoptosis, and decreasing the expression of miR-23a-5p and miR-28a-5p in HSC, which reduces proliferation and increases apoptosis in these cells. Finally, the hepatic expression of COX-2 and levels of serum PGE₂ and miRNAs in patients with NASH or liver fibrosis has been analyzed. Induction of endogenous COX-2 and PGE₂ expression has been observed as part of a defense mechanism in response to liver damage.

Índice

<i>Clave de abreviaturas</i>	29
<i>1. Introducción</i>	35
1.1. Ciclooxigenasas.	37
1.1.1. Biosíntesis de prostanoïdes.	37
1.1.2. Isoformas.	38
1.1.2.1. Localización y funciones.	38
1.1.2.2. Estructura génica y regulación de su expresión.	39
1.1.2.3. Estructura proteica.	41
1.1.3. Mecanismo de acción de las PGs.	42
1.1.3.1. PGE ₂ . Receptores EPs.	42
1.2. Expresión de COX-2 en hígado.	44
1.2.1. COX-2 y daño hepático agudo.	45
1.3. Papel de COX-2 en enfermedades hepáticas crónicas.	46
1.3.1. EHNA y enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA).	46
1.3.2. Fibrosis hepática.	49
1.3.3. Papel de COX-2 en EHNA y fibrosis hepática.	51
1.4. miARNs.	51
1.4.1. Papel de miARNs en fibrosis hepática.	54
1.4.2. Relación entre miARNs y COX-2.	55
<i>2. Objetivos</i>	57
<i>3. Materiales y métodos</i>	61
3.1. Reactivos.	63
3.2. Pacientes.	63
3.3. Evaluación histopatológica de los pacientes.	64
3.4. Experimentación animal.	64
3.5. Evaluación histopatológica de los animales.	65

3.6. Aislamiento y cultivo de hepatocitos.....	66
3.7. Aislamiento de células de Kupffer.....	67
3.8. Aislamiento y cultivo de HSC.	67
3.9. Aislamiento de NPCs para su análisis por citometría de flujo.	68
3.10. Citometría de flujo.	68
3.11. Cultivos de líneas celulares de esteladas hepáticas.	69
3.12. Determinación de metabolitos, citoquinas y hormonas, y ensayo del MTT.....	69
3.13. Medida del estado redox intracelular.	70
3.14. Ensayos de inmunofluorescencia.	71
3.15. Ensayos de inmunohistoquímica fluorescente.	71
3.16. Análisis del ciclo celular.	72
3.17. Análisis por microarray de miARNs.	72
3.18. Extracción de ARN y análisis por RT-PCR.....	73
3.19. Construcción y transfección de los vectores de miARN.	76
3.20. Análisis por WB.....	77
3.21. Análisis de datos.	79
<i>4. Resultados</i>	81
4.1. Análisis de la contribución de PGE ₂ dependiente de COX-2 al desarrollo de la EHNA y fibrosis hepática en modelos murinos. Vías de señalización y mecanismos moleculares implicados.....	83
4.1.1. La expresión constitutiva de COX-2 en el hepatocito protege a los ratones frente a la esteatohepatitis inducida por una dieta MCD.	83
4.1.2. La expresión de PGE ₂ dependiente de COX-2 protege a los hepatocitos aislados frente a la apoptosis y el estrés oxidativo inducidos por TGF-β1.....	93
4.1.3. La expresión constitutiva de COX-2 en el hepatocito protege frente a la fibrosis inducida por CCl ₄ , mediante la inhibición de la activación de las HSC tanto in vivo como in vitro.	96

4.2. Análisis del patrón de expresión de miARNs hepáticos en las líneas transgénicas para COX-2, y su papel en el desarrollo y evolución de la fibrosis hepática.	102
4.2.1. La expresión constitutiva de COX-2 en el hepatocito inhibe la expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p en las HSC en un modelo de fibrosis hepática inducida por CCl ₄	103
4.2.2. La expresión de PGE ₂ revierte el aumento en la expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p inducido por TGF-β1 en las HSC.	107
4.2.3. Relación entre los miARNs regulados por COX-2 y las vías de señalización de TGF-β1 y apoptosis. Genes diana implicados.	110
4.2.4. PGE ₂ disminuye la proliferación y aumenta la apoptosis en las HSC.	113
4.2.5. La sobreexpresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p induce la fibrosis hepática, mediante la activación de las HSC.....	115
4.3. Análisis de la expresión de COX-2 y los niveles de PGE ₂ en biopsias hepáticas y sueros de pacientes con EHGNA y fibrosis.	119
4.3.1. Análisis de la expresión de COX-2 en biopsias hepáticas de pacientes con EHGNA. Relación con el progreso de la enfermedad.	119
4.3.2. Análisis de los niveles de PGE ₂ y de la expresión de miARNs en sueros de pacientes con fibrosis. Relación con el progreso de la enfermedad.	120
<i>5. Discusión</i>	123
<i>6. Conclusiones</i>	139
<i>7. Bibliografía</i>	143
<i>Anexo</i>	169
Publicaciones derivadas del presente trabajo.....	171
Otras publicaciones en las que la doctoranda ha participado durante el transcurso de la tesis.	171

Clave de abreviaturas

15-PGDH	15-hidroxi prostaglandina deshidrogenasa dependiente de NAD ⁺
3'UTR	Región 3' no traducida
AA	Ácido araquidónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
Ago	Proteína argonauta
AINEs	Anti-inflamatorios no esteroideos
ALT	Alanina transaminasa
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
AP-1	Proteína activadora 1
APAP	Paracetamol
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
AST	Aspartato transaminasa
BDL	Ligación del conducto biliar
BMP2	Proteína morfogenética ósea 2
BSA	Albúmina de suero bovina
Cat	Catalasa
CAV1	Caveolina 1
CCl₄	Tetracloruro de carbono
CCR2	Receptor de quimioquina C-C 2
CDH1	Cadherina 1
C/EBP/NF-IL6	Proteína potenciadora de enlace a CCAAT
CHC	Carcinoma hepatocelular
CMI	4-ciano-3-metil-isoquinolina
COL1A1	Colágeno
ConA	Concanavalina A
COX	Ciclooxigenasa
cPGES	Prostaglandina E sintasa citosólica
CRE	Elemento de respuesta a AMPc
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conectivo
Ctrl	Control
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DFU	5,5-dimetil-3(3-fluorofenil)-4-(4-metilsulfonil) fenil-2 (5H)-furanona
D-Gal	D-galactosamina
DGCR8	DiGeorge región crítica 8
DTNB	5,5'-ditio-bis-2-(ácido nitrobenzoico) <i>E-box</i> : Caja E
E.E.	Error estándar
EHGNA	Enfermedad del hígado graso no alcohólico
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica
ENA	Esteatosis no alcohólica
ERAs	Elementos ricos en AU
ERK	Quinasas reguladoras de señales extracelulares
ERM	Elementos de respuesta a miARNs
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FBS	Suero bovino fetal

FI	Factor de inducción
GFP	Proteína fluorescente verde
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
GSHt	Glutación total
Gsr	Glutación reductasa
GSSG	Glutación oxidado
G_{as}	Proteínas G-estimuladoras
H₂DCFDA/DCFH-DA/DCFH	2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetato
hCOX-2-Tg	Ratón transgénico portador del gen COX-2 humano en el hepatocito
HCR	Región específica de control hepático
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HFD	Dieta grasa
HGF	Factor de crecimiento de los hepatocitos
HN	Hígado normal
HP	Hepatectomía parcial
HSC	Células esteladas hepáticas
HSCa-MF	Miofibroblastos activados
HSCq	HSC quiescentes
HuR	Proteína de unión a ARN
H&E	Hematoxilina-Eosina
IL-1β	Interleuquina 1 β
IL-6	Interleuquina 6
i.p.	Intraperitonealmente
IRS1	Sustrato del receptor de insulina 1
JNK/SAPK	Quinasa c-Jun N-terminal/Proteína quinasa activada por estrés
LPO	Peroxidación de lípidos
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MCD	Dieta deficiente en metionina y colina
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
MDA	Malondialdehído
MEC	Matriz extracelular
MEK	Proteína quinasa quinasa activada por mitógenos
miARNs/miR	MicroARNs
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
mPGES	Prostaglandina E sintasa microsomal
MRP4	Proteína 4 asociada a la resistencia a múltiples fármacos
MTC	Tinción Tricrómica de Masson
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NF-κB/p65	Factor nuclear potenciador de cadenas ligeras κ de células B
NPCs	Células hepáticas no parenquimales
Oil	Aceite de oliva
p	Coefficiente de correlación de Pearson
P.C.	Peso corporal
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
Pdgfr	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGE₂	Prostaglandina E ₂

PGES	Prostaglandina E sintasa
PGG₂	Prostaglandina G ₂
PGH₂	Prostaglandina H ₂
PGHS	Prostaglandina G/H sintasa/Prostaglandina H sintasa
PGI₂	Prostaciclina
PGs	Prostaglandinas
PGT	Transportador de prostaglandina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLA₂	Fosfolipasa A ₂
PLC	Fosfolipasa C
PPAR	Receptores nucleares activados por proliferador de peroxisoma
PPRE	Elemento de respuesta a proliferador de peroxisomas
Pre-miARN	miARN precursor
Pri-miARN	miARN primario
PTGS	Prostaglandina endoperóxido sintasa
R	Modelo de recuperación
R²	Coefficiente de determinación
RCD	Dieta control
RI	Resistencia a la insulina
RISC	Complejo silenciador inducido por ARN
RLC	Complejo de carga RISC
RT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
Sem.	Semanas
Sod	Superóxido dismutasa
Sp1	Proteína específica 1
SER	Elemento de respuesta a esterol
SSA	5-ácido sulfosalicílico
TAA	Tioacetamida
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
TEM	Transición epitelio-mesénquima
TET1	Tet metilcitosina dioxigenasa 1
Tg	Transgénico
TGF-β1	Factor de crecimiento transformador β1
TGs	Triglicéridos
TIMPs	Inhibidores de tejido de metaloproteinasas
TMP	1,1,3,3-tetrametoxipropano
TN	Toda la noche
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
TRBP	Proteína de unión a ARN Tar
TXA₂	Tromboxanos
U.A.	Unidades arbitrarias
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WB	Western blot
Wt	<i>Wild-type</i> /genotipo salvaje
α-SMA	α-actina del músculo liso

1. Introducción

1.1. Ciclooxygenasas.

1.1.1. Biosíntesis de prostanoides.

Los eicosanoides son lípidos biológicamente activos, derivados del metabolismo del ácido araquidónico (AA), e incluyen a prostanoides, leucotrienos y productos derivados de la vía de la epoxigenasa (117, 143, 161). Estas moléculas participan en la regulación de muchos procesos fisiológicos, entre ellos la inflamación, la ovulación, la respuesta inmunitaria o la mitogénesis; y en procesos patológicos, como el cáncer (117, 158, 161). El AA es un ácido graso polinsaturado procedente de la dieta (sintetizado a partir del ácido linoleico), localizado en la membrana celular. La acción de fosfolipasas, principalmente fosfolipasa A₂ (PLA₂), libera el AA de los fosfolípidos de membrana. Esto constituye un paso clave en la síntesis de eicosanoides, ya que la liberación del AA determina la cantidad de eicosanoides sintetizados (90, 125). Tras esto, el AA puede volver a la membrana como fosfolípido, difundirse al medio extracelular o ser metabolizado por diferentes enzimas como COX, lipoxigenasa y citocromo P-450 monooxigenasa (117).

COX, también llamada prostaglandina G/H sintasa, prostaglandina H sintasa (PGHS) o prostaglandina endoperoxido sintasa (PTGS), es la enzima que cataliza la reacción limitante en la biosíntesis de prostanoides (prostaglandinas (PGs), prostaciclina y tromboxanos), convirtiendo el AA en prostaglandina H₂ (PGH₂) (141, 143). Esto es posible gracias a la actividad ciclooxygenasa y peroxidasa que presenta la enzima. En primer lugar, en la reacción ciclooxygenasa (*bis*-oxigenasa), el AA es ciclado y oxigenado (con dos moléculas de oxígeno), dando lugar a prostaglandina G₂ (PGG₂). A continuación, en la reacción peroxidasa, el grupo 15-hidroperoxil de PGG₂ es reducido a 15-hidroxil, generando PGH₂ (141, 142, 144). Finalmente, PGH₂ sirve como sustrato de una serie de isomerasas y sintasas específicas de tejido, que sintetizan las PGs (PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}), prostaciclina (PGI₂) y tromboxanos (TXA₂), productos finales de esta vía (128, 138) (Figura 1).

1. Introducción

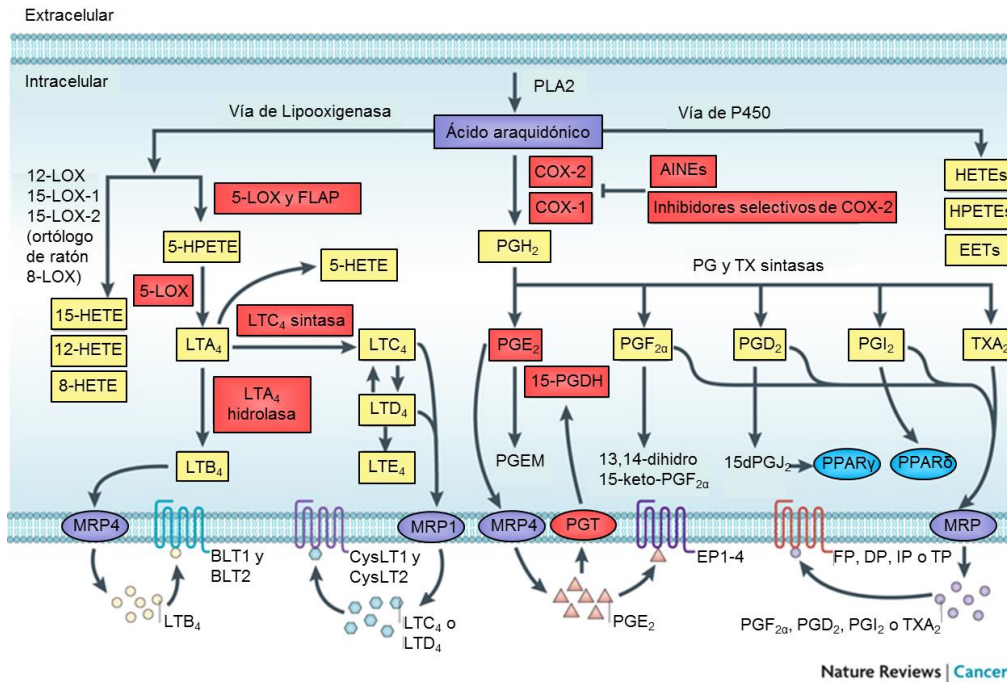


Figura 1. Diagrama de las vías de síntesis de eicosanoides. Adaptado de Wang & DuBois (158).

1.1.2. Isoformas.

1.1.2.1. Localización y funciones.

Se conocen dos isoformas de COX: COX-1 y COX-2. COX-1 se expresa de forma constitutiva en prácticamente todos los tejidos, y es responsable de la síntesis de PGs que participan en el mantenimiento de la homeostasis celular, regulando procesos como la integridad de la mucosa gástrica o el flujo sanguíneo renal. Sin embargo, COX-2 es prácticamente indetectable en condiciones basales. Su expresión aumenta rápidamente, con carácter transitorio, en respuesta a diversos estímulos, como factores de crecimiento, promotores tumorales, hormonas, endotoxinas y citoquinas, entre otros. Por tanto, se considera a COX-2 la isoforma inducible, y participa en procesos patológicos como inflamación o cáncer. Estudios recientes han observado que COX-2 se expresa de forma constitutiva en el cerebro, las células de la mácula densa o la placenta, indicando que también participa en la regulación de procesos fisiológicos no patológicos (117, 124). Estas dos isoformas pueden generar variantes de COX, debido a mutaciones o *splicing* alternativo. Por ejemplo, COX-3 se localiza en el cerebro, y consiste en el ARN mensajero (ARNm) de COX-1 que conserva el intrón 1. Por su parte, PCOX-1, otra variante de

COX-1, presenta una delección del exón 5 al 8. Sin embargo, todavía no se conoce con claridad el papel específico de estas variantes (125, 141).

Las diferencias funcionales existentes entre ambas isoformas se deben principalmente a variaciones en su localización, estructura y regulación de su expresión. Respecto a su localización subcelular, ambas isoenzimas se localizan en el retículo endoplásmico y en la membrana nuclear. COX-1 se distribuye de forma equitativa entre ambos compartimentos, mientras que COX-2 se encuentra más concentrada en la membrana nuclear. Esto sugiere que los productos derivados de COX-2 se distribuyen preferentemente por el núcleo, modulando así la transcripción de genes diana (125, 161).

1.1.2.2. Estructura génica y regulación de su expresión.

El gen de COX-1 humano se compone de 11 exones y 10 intrones, con una longitud de 22 Kb. Está localizado en el cromosoma 9 y se transcribe como un ARNm de 2,8 Kb (149, 161). La estructura génica está muy conservada entre diferentes especies. Su región promotora presenta un alto contenido en guanina-citosina e incluye varios elementos de regulación transcripcional, entre los que se incluyen sitios de unión de la proteína específica 1 (Sp1) y un sitio de unión a la proteína activadora 1 (AP-1), que interactúa con los motivos Sp1 para regular la expresión de COX-1. Sin embargo, carece de la presencia de una caja TATA, lo que convierte a COX-1 en un gen constitutivo (Figura 2). Esto coincide con su patrón de expresión, ya que sus niveles son relativamente estables en la mayoría de los tejidos en los que se expresa. Sin embargo, hay excepciones; su expresión puede aumentar durante el desarrollo, ya que se induce en líneas celulares durante el proceso de diferenciación. A pesar de todo, el mecanismo que regula su activación no se conoce con claridad, al contrario que en el caso del gen COX-2, más estudiado (75, 144). Por otro lado, variaciones en la concentración del AA influyen en la actuación de una u otra enzima. Bajas concentraciones de AA ($<2,5 \mu\text{M}$), generalmente procedentes de una fuente endógena, favorecen la síntesis de prostanoïdes a través de COX-2, mientras que elevadas concentraciones ($>10 \mu\text{M}$) favorecen su síntesis por COX-1. En este caso, el AA procede de una fuente exógena, o es liberado durante los procesos de inflamación aguda o daño celular, lo que sugiere que la presencia constitutiva de COX-1 puede ser responsable de la generación de PGs durante las fases tempranas de la inflamación, previo a la sobreexpresión de COX-2 (125, 143).

1. Introducción

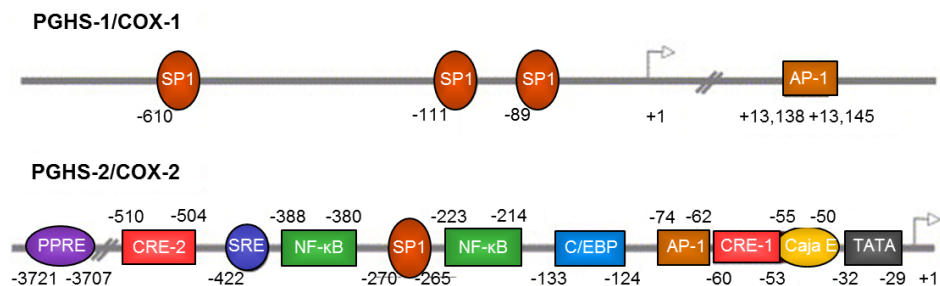


Figura 2. Representación esquemática de los elementos reguladores funcionales en los promotores de los genes *COX-1* y *COX-2* humanos. Adaptado de Kang *et al.* (75).

La estructura genómica del gen de COX-2 humano se compone de 10 exones y 9 intrones, con una longitud de 8,3 Kb. Se localiza en el cromosoma 1 y su ARNm se transcribe como 3 variantes de 4,5, 4 y 2,6 Kb, siendo las mayoritarias las de 4,5 y 2,6 Kb. A esta última variante le faltan 1,9 Kb de la región 3'UTR (región 3' no traducida) (75, 149). Su región promotora presenta varios elementos de regulación transcripcional, entre los que se incluyen un elemento de respuesta a proliferador de peroxisomas (PPRE), dos elementos de respuesta a adenosina monofosfato cíclico (AMPC) (CRE), un elemento de respuesta a esterol (SRE), dos lugares de unión a NF-κB/p65 (Factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B), un lugar de unión a Sp1, un motivo de unión a la proteína potenciadora de enlace a CCAAT (también llamada C/EBP o NF-IL6), un sitio AP-1, una caja E (*E-box*) y una caja TATA (Figura 2). Al contrario que en el gen de COX-1, la secuencia del promotor de COX-2 varía de unas especies a otras. Por ejemplo, en ratones presenta un único sitio de unión a NF-κB en vez de dos, y dos motivos C/EBP en vez de uno, respecto a lo observado en el humano. Además, el extremo 3'UTR del gen de COX-2 presenta 23 copias del elemento desestabilizador del ARNm "ATTTA", que participa en su regulación post-transcripcional, algo de lo que carece el gen de COX-1 (75).

El mecanismo que media la activación de la expresión de COX-2 se ha estudiado con más detalle, e implica la participación de varias vías de señalización junto a algunos de los elementos reguladores del promotor de COX-2, como el sitio de unión a NF-κB, C/EBP, CRE y *E-box*. La implicación de unas vías u otras varía dependiendo del estímulo y del tipo celular. Las vías de señalización de NF-κB y MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) (ERK1/2 (quinasas reguladoras de señales extracelulares), JNK/SAPK (quinasa c-Jun N-terminal/proteína quinasa activada por estrés) y p38/RK/Mpk2) tienen un papel importante, ya que participan en la inducción de COX-2 en muchos de los

modelos estudiados. La presencia de factor de necrosis tumoral α (TNF α), interleuquina 1 β (IL-1 β), lipopolisacárido (LPS), endotelina e hipoxia inducen la señalización por NF- κ B, que se transloca al núcleo. Aquí induce la expresión de COX-2 mediante su unión a los sitios específicos de NF- κ B del promotor. Las vías de señalización de la familia de las MAPK se activan por la presencia de estímulos pro-inflamatorios, LPS, factores de crecimiento, oncogenes o estrés oxidativo, entre otros. Su inducción regula la expresión de diversos genes, entre los cuales se encuentra COX-2. Por el contrario, receptores nucleares activados por proliferador de peroxisoma (PPAR), glucocorticoides y citoquinas anti-inflamatorias inhiben la expresión de COX-2 (143, 149).

1.1.2.3. Estructura proteica.

COX-1 (576 aminoácidos) y COX-2 (604 aminoácidos) tienen un peso molecular de 70 y 72 kDa respectivamente, y comparten el 61% de su secuencia de aminoácidos (125, 149). Ambas enzimas presentan los mismos dominios funcionales en su estructura proteica: 1) un dominio con un péptido señal amino-terminal, que dirige los polipéptidos al lumen del retículo endoplásmico; 2) un dominio de dimerización, que mantiene unidos los dímeros de COX-1 y COX-2; 3) un dominio de unión a la membrana; y 4) un dominio catalítico, que conforma el 80% de la proteína y contiene los sitios de actividad ciclooxigenasa y peroxidasa (141). Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) compiten directamente con el AA por su unión al sitio de actividad ciclooxigenasa, inhibiéndola. Sin embargo, su acción no afecta a la actividad peroxidasa. Dados los efectos adversos (como toxicidad gastrointestinal) generados por el uso de estos AINEs, se desarrollaron inhibidores selectivos para COX-2. Para ello se utilizó una de las diferencias más importantes en la estructura proteica de ambas COX, presente en el sitio de actividad ciclooxigenasa. Esta diferencia consiste en la sustitución de isoleucina en las posiciones 523 y 434 en COX-1 por valina en COX-2, lo que genera una estructura secundaria hidrofóbica en forma de bolsillo en COX-2 al que pueden acceder estos fármacos selectivos (141, 144).

1.1.3. Mecanismo de acción de las PGs.

La acción específica de los prostanoideos es muy variada, depende de su expresión y la de sus receptores según el tipo celular en el que se encuentren. Por ejemplo, TXA_2 estimula la agregación plaquetaria y la vasoconstricción, mientras que PGI_2 está implicada en la vasodilatación, la nocicepción y antitrombosis. $\text{PGF}_{2\alpha}$ participa en la contracción uterina y el parto; y PGD_2 media la vasodilatación e inhibe la agregación plaquetaria, además de afectar a la temperatura corporal y al ciclo de sueño-vigilia. Por su parte, PGE_2 participa en diferentes procesos, tales como vasodilatación, inflamación y respuesta inmune, ovulación, resorción ósea o cáncer, entre otros. Sin embargo, dependiendo del tipo celular en el que actúe, algunas de sus funciones son opuestas (15, 52).

Los prostanoideos ejercen sus efectos biológicos de forma paracrina o autocrina, mediante su unión a dos tipos de receptores: específicos de membrana (que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCR)) o nucleares (PPARs). Para ello, el primer paso es su liberación al medio extracelular, por difusión a través de la membrana celular o por transportadores específicos. Entre estos se encuentra proteína 4 asociada a la resistencia a múltiples fármacos (MRP4) (83). Debido a su naturaleza transitoria, estos compuestos deben actuar cerca de sus lugares de síntesis, uniéndose a sus receptores específicos. Los receptores de membrana incluyen a DP_1 y DP_2 para PGD_2 ; EP_1 , EP_2 , EP_3 y EP_4 para PGE_2 ; FP para $\text{PGF}_{2\alpha}$; IP para PGI_2 y TP para TXA_2 . Hay casos en los que algunas PGs y sus metabolitos se unen a los receptores nucleares PPAR. Por ejemplo, PGI_2 puede activar $\text{PPAR}\delta$, y 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ - PGJ_2 (un producto de PGD_2) es un ligando natural de $\text{PPAR}\gamma$. PGE_2 también puede activar $\text{PPAR}\delta$ indirectamente en algunos contextos (52, 158). Por último, para su degradación intracelular, las PGs se importan a través de un transportador de prostaglandina (PGT), tras lo que son inactivadas (principalmente PGE_2) por la acción de 15-hidroxiprostaglandina deshidrogenasa dependiente de NAD^+ (15-PGDH) (44, 83, 109) (Figura 1).

1.1.3.1. PGE_2 . Receptores EPs.

PGE_2 es el metabolito más abundante generado por la acción de COX y prostaglandina E sintasa (PGES) en el metabolismo del AA. Existen dos tipos de PGES, la citosólica (cPGES) y las microsomales (mPGES-1 y mPGES-2). La acción de PGE_2 se

da a través de su unión con sus receptores específicos: EP₁, EP₂, EP₃ y EP₄. EP₃ y EP₄ son los más ampliamente distribuidos, expresándose en la mayoría de tejidos, y tienen una elevada afinidad por PGE₂. Por el contrario, la expresión de EP₁ se restringe a varios órganos, como el riñón, los pulmones y el estómago, y EP₂ es el receptor menos abundante. Ambos presentan una baja afinidad por PGE₂. Estas diferencias son las que conducen a la activación de unos receptores u otros, concediendo a PGE₂ la capacidad de mediar gran variedad de funciones biológicas (120, 128).

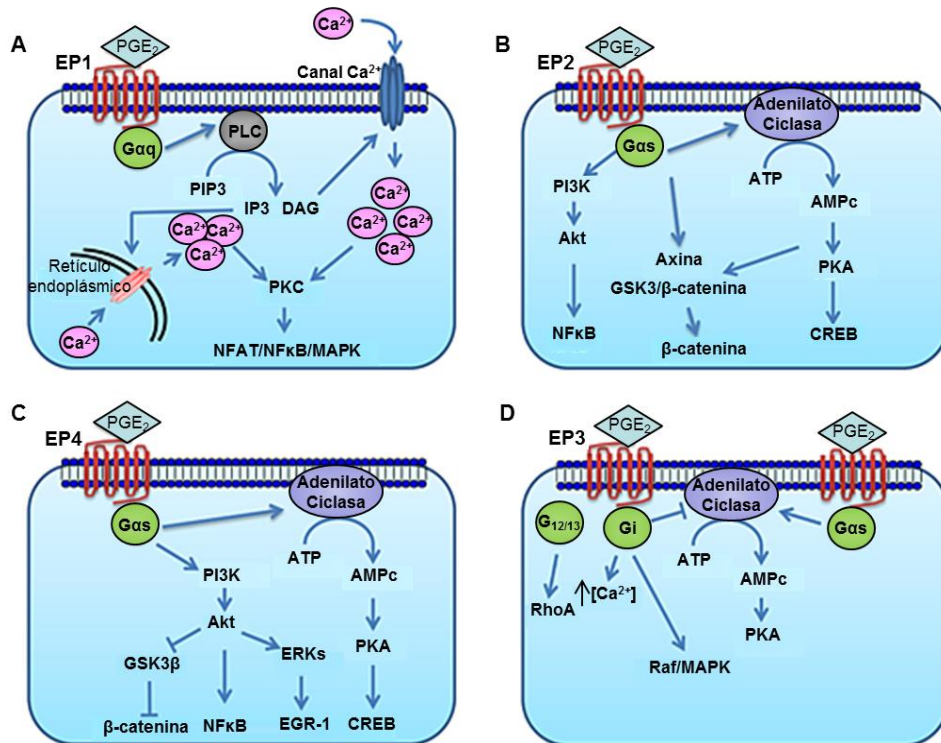


Figura 3. Vías de señalización activadas por los receptores EP. Adaptado de Callaghan & Houston (120).

EP₁ se acopla a la subunidad de la proteína G_{αq}, que activa el metabolismo del fosfatidilinositol. La activación de fosfolipasa C (PLC) conduce a un aumento de Ca²⁺ intracelular y la activación de la proteína quinasa C (PKC), que induce la activación del factor nuclear de células T activadas (NFAT), NF-κB y la vía de señalización de MAPK. Tanto EP₂ como EP₄ se acoplan a proteínas G-estimuladoras (G_{αs}). Activan la adenilato ciclasa, incrementando los niveles de AMPc, lo que resulta en la activación de las vías de señalización de proteína quinasa A (PKA), GSK3β/β-catenina y fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)/AKT. Por último, existen diversas variantes de EP₃, caracterizadas por sus diferencias en el extremo C-terminal citoplásmico. Como resultado, EP₃ puede acoplarse a múltiples subunidades de la proteína G (G_i, G_s, G_{12/13}), pudiendo estimular o

inhibir la expresión de AMPc, aumentar Ca^{2+} o activar la expresión de la proteína Rho (15, 120) (Figura 3).

1.2. Expresión de COX-2 en hígado.

En mamíferos, el hígado es un órgano que constituye aproximadamente un 2,5% del peso corporal de un adulto y entre sus funciones, juega un papel central en la absorción eficiente de aminoácidos, carbohidratos, ácidos biliares, colesterol, proteínas, lípidos y vitaminas para su almacenamiento y metabolismo, liberándolos posteriormente en el flujo sanguíneo o biliar para que lleguen al resto del organismo. También participa en la regulación del volumen sanguíneo y constituye el órgano principal de biotransformación y defensa frente a macromoléculas externas y xenobióticos. Está compuesto por muchos tipos celulares, entre los que destacan los hepatocitos o células parenquimales, que representan la población celular más grande ya que comprenden el 60% de las células totales, y el 80% del volumen total del hígado. El porcentaje restante incluye a las células hepáticas no parenquimales (NPCs). De entre estas, las más relevantes son los linfocitos (o células de Pit); las células epiteliales biliares (colangiocitos), que actúan principalmente como un revestimiento del conducto para el flujo biliar; las células endoteliales sinusoidales, que pueden comprender hasta el 20% de las células hepáticas y constituyen la primera barrera entre la sangre y los hepatocitos; las células de Kupffer (macrófagos residentes hepáticos), que derivan de monocitos circulantes y representan aproximadamente el 15% de las células hepáticas; y las HSC, que comprenden en torno al 5% y participan en la regeneración y la fibrosis y cirrosis hepática (12, 103).

Los hepatocitos fetales responden bien tanto *in vivo* como *in vitro* a la mayoría de los estímulos que regulan positivamente la expresión de COX-2 en otros tipos celulares, incluyendo a LPS, IL-1 β , TNF- α y especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, los hepatocitos adultos no son capaces de inducir la expresión de COX-2, independientemente del estímulo utilizado, mientras que las células de Kupffer y las HSC mantienen la capacidad de expresar COX-2 tras la adición de LPS o citoquinas pro-inflamatorias. Los hepatocitos fetales pierden esta capacidad rápidamente tras el nacimiento, y ya no se observa en animales con más de dos días de edad. Esto indica que la diferenciación de los hepatocitos contribuye a inhibir la inducción de la expresión de COX-2 (105, 107). Respecto al mecanismo responsable de esta inhibición, en un trabajo

previo del grupo se observó que la sobreexpresión de C/EBP- α inhibe la actividad del promotor de COX-2 en hepatocitos y líneas celulares de hepatoma. Esto se da a través de su unión al sitio C/EBP o NF-IL6 del promotor. Además, al mantener un cultivo de hepatocitos adultos durante un tiempo prolongado, se restaura la inducción de la expresión de COX-2, correlacionándose con la desaparición de C/EBP- α (18).

En el hígado, las PGs participan principalmente en procesos de regeneración, estimulando la proliferación de los hepatocitos, en la remodelación tisular y en la hipertensión portal (117). Por ejemplo, se ha observado que tras someter al hígado a una hepatectomía parcial (HP) se induce la expresión de COX-2 en el hepatocito, correlacionándose con una disminución de la expresión de C/EBP- α . La presencia de COX-2 es importante para las primeras etapas del proceso de regeneración y proliferación celular que tiene lugar tras la HP, ya que su inhibición lo retrasa (19, 133). Ocurre algo similar en la regeneración observada tras un modelo hepatotóxico inducido por tioacetamida (TAA), que también induce COX-2 en el hepatocito. De nuevo se ve que este aumento se correlaciona con una disminución de C/EBP- α . Además, la inhibición de COX-2 aumenta el daño hepático, perjudicando el proceso de regeneración (41).

1.2.1. COX-2 y daño hepático agudo.

La HP constituye un modelo bien establecido de daño hepático agudo, junto a LPS/D-galactosamina (D-Gal) y concanavalina A (ConA). Para estudiar el papel de COX-2 en estos modelos, en el trabajo de Mayoral *et al.* (107), se utilizaron animales que expresan COX-2 de forma constitutiva en el hepatocito. En estos casos, se ha determinado un papel protector de COX-2 frente al daño hepático agudo, ya no solo porque acelera la proliferación de los hepatocitos tras la HP, sino también porque disminuye la apoptosis y la necrosis de los hepatocitos causada por LPS/D-Gal y ConA. Además, un tratamiento con DFU (5,5-dimetil-3(3-fluorofenil)-4-(4-metilsulfonil) fenil-2(5H)-furanona, inhibidor selectivo de COX-2) revierte sus efectos. Sin embargo, existen controversias respecto a la función de COX-2 en el daño hepático agudo, ya que en el trabajo de Liong *et al.* (97), determinan que la indometacina (inhibidor de COX-1 y 2) y la nimesulida (inhibidor de COX-2) protegen al hígado frente a la hepatotoxicidad inducida por LPS/D-Gal.

1.3. Papel de COX-2 en enfermedades hepáticas crónicas.

La expresión de COX-2 también se ha detectado en diversas patologías hepáticas crónicas, como en pacientes y modelos animales de fibrosis y cirrosis, infección con el virus de la hepatitis B o C, EHNA, líneas celulares de hepatoma y carcinoma hepatocelular (CHC) (40, 65). Pero al igual que en los modelos de daño agudo, existen numerosas controversias respecto al papel que presentan las PGs dependientes de COX-2 en estas patologías, que se explicarán más adelante.

Respecto a su papel en cáncer, COX-2 favorece el desarrollo de diversos tipos de tumores, incluyendo al CHC, incrementando la proliferación e inhibiendo la apoptosis de las células tumorales. Esto relaciona a COX-2 con los procesos de diferenciación, invasión y metástasis que ocurren durante la iniciación de estas patologías. Además, su expresión es mayor en las fases tempranas, mientras que disminuye en las más avanzadas. Esta inhibición de su expresión se ha relacionado con una hipermetilación del promotor de COX-2 y una deacetilación de histonas (40). Sin embargo, el papel específico de COX-2 en el CHC todavía no está claro. En el trabajo de Yang *et al.* (167), se ha observado una relación inversa entre la expresión de COX-2 y el receptor EP₁ en biopsias hepáticas de pacientes con CHC, a medida que progresa la enfermedad. Esto sugiere que COX-2 es importante solo durante el inicio del CHC, mientras que EP₁ participa en la progresión tumoral. Sin embargo, en un estudio reciente se ha determinado que, utilizando un modelo de ratón transgénico para COX-2, el aumento de COX-2 promueve el desarrollo del CHC, promoviendo la hipermetilación de promotores por disminución de la expresión de TET1 (tet metilcitosina dioxigenasa 1), silenciando genes supresores de tumores y activando vías oncogénicas (25).

1.3.1. EHNA y enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA).

Se considera que la EHGNA es el trastorno hepático más frecuente que se da en los países occidentales (afecta a un 20-30% de la población adulta), aunque se diagnostica cada vez más en todo el mundo. En general, se estima que en Europa la prevalencia de la EHGNA se da entre un 2-44% de la población (incluyendo a los pacientes obesos), y entre un 42,6-69,5% de pacientes afectados por una diabetes tipo 2. En Estados Unidos se valora que unos 80 millones de adultos se encuentran afectados por esta enfermedad, representando al 31% de la población, y hasta el 74% en pacientes diabéticos. La

prevalencia de la EHGNA también se está incrementando en Asia, englobando al 15-30% de la población (37, 157).

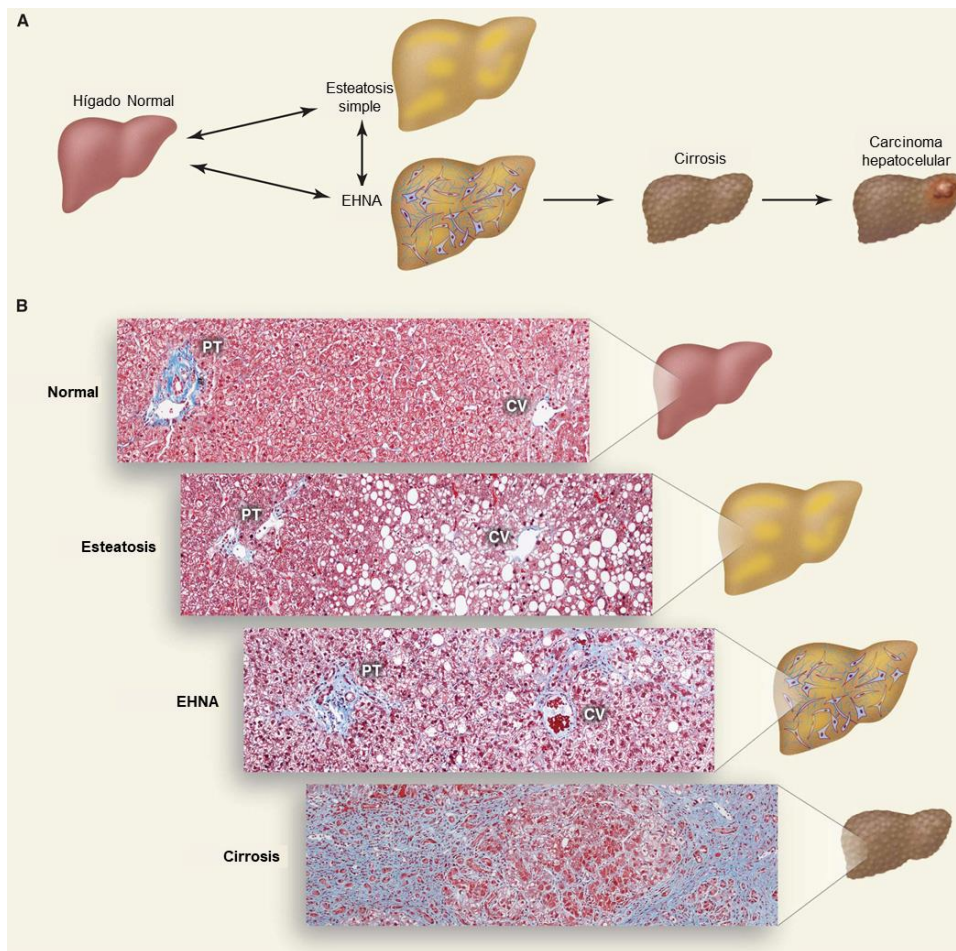


Figura 4. Espectro de la EHGNA. Adaptado de Cohen *et al.* (34).

Esta enfermedad comprende un amplio espectro de daño hepático, que va desde la esteatosis simple (esteatosis no alcohólica (ENA)) hasta la EHNA. La ENA representa una acumulación de grasa en el hígado, principalmente en forma de triglicéridos (TGs), que excede su tasa de exportación o catabolismo pero no implica inflamación. Por su parte, la EHNA aparece como resultado de la progresión de esta patología. Se caracteriza por un aumento de la inflamación, “ballooning” (forma de daño hepatocelular (apoptosis) característica de la esteatohepatitis, en la que los hepatocitos incrementan su tamaño y presentan un citoplasma blanco y esponjoso) y en última instancia fibrosis hepática, aunque ésta última no siempre se asocia con el desarrollo de la EHNA. Se la considera una de las causas más importantes de hipertensión portal, fallo hepático y CHC, ya que si la progresión continúa, los pacientes pueden desarrollar cirrosis, incrementando el riesgo de sufrir estas patologías (16, 163) (Figura 4).

1. Introducción

Se considera a la EHGNA (y a la EHNA) como la manifestación hepática del síndrome metabólico, dada su asociación con la resistencia a la insulina (RI), la intolerancia a la glucosa, la obesidad y la diabetes tipo II. Esto también incrementa el riesgo de que los pacientes mueran de enfermedades cardiovasculares y otros tipos de cáncer (163). La patogénesis de la EHGNA y los procesos que promueven la progresión de ENA a EHNA todavía no se comprenden con claridad. Inicialmente se propuso la hipótesis de los “*dos hits*”, donde el “*primer hit*” consiste en el conjunto de procesos que llevan a ENA, e incluyen RI, obesidad y dieta rica en grasas. El “*segundo hit*” implica inflamación y estrés oxidativo, que desembocan en el desarrollo de EHNA y fibrosis. Sin embargo, esta hipótesis ha derivado en una más compleja (“*multiple parallel hits*”), dada la implicación de diversos factores en el desarrollo de esta enfermedad (4, 157). En términos generales, se conoce que la RI incrementa la liberación de ácidos grasos a la circulación sistémica y favorece la acumulación de lípidos en el hígado. Esta RI no es dependiente de la obesidad o la diabetes, pero su presencia empeora el desarrollo de la EHGNA. Sin embargo, también se ha visto que los ácidos grasos libres contribuyen al desarrollo de la RI. Por tanto, no se puede afirmar del todo que la ENA sea una consecuencia o una causa de la RI. Si esta acumulación de lípidos se prolonga, termina por inducir citotoxicidad en las células. Esta lipotoxicidad causa disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, que conducen al daño y muerte celular de los hepatocitos. El estrés oxidativo y la apoptosis de los hepatocitos contribuyen al desarrollo de la inflamación activando las HSC y las células de Kupffer. Junto a los hepatocitos dañados, ambos tipos celulares liberan diversas citoquinas pro-inflamatorias, como TNF- α o interleuquina 6 (IL-6). La activación de las vías pro-inflamatorias promueve la infiltración de leucocitos, la amplificación del daño, y en última instancia, fibrosis. Sin embargo, a pesar de los estudios realizados, la patogénesis de la EHNA no se ha esclarecido completamente (43, 104, 163).

El objetivo de los tratamientos frente a la EHNA consiste en prevenir la cirrosis y disminuir la mortalidad derivada de enfermedades cardiovasculares y distintos tipos de cáncer asociados a la misma (como el CHC). Estos tratamientos se basan principalmente en cambios en el estilo de vida (en la dieta y ejercicio). Los tratamientos farmacológicos (como vitamina E y pioglitazona) todavía no están oficialmente aprobados. Dada la complejidad de la enfermedad, se están desarrollando nuevas terapias más específicas, enfocadas en las causas moleculares que participan en el desarrollo y la progresión de la EHNA (22, 37, 163).

1.3.2. Fibrosis hepática.

La fibrosis hepática es un proceso de cicatrización que ocurre como respuesta al daño hepático subyacente a las enfermedades crónicas del hígado que cursan con un proceso inflamatorio durante cierto tiempo. Entre estas, se encuentran la EHNA, la infección por el virus de la hepatitis, el consumo excesivo de alcohol, enfermedades metabólicas hereditarias o desórdenes colestáticos. El proceso se inicia con una respuesta inflamatoria, e implica alteraciones en la composición y cantidad de la matriz extracelular. Pero si la lesión prevalece, se produce la fibrosis, con una acumulación excesiva de fibras de colágeno (COL1A1) y otros componentes de la matriz en el parénquima hepático. En última instancia, la fibrosis hepática deriva en cirrosis, que se caracteriza por una remodelación aberrante de la arquitectura hepática, asociada a la formación de septos y nódulos regenerativos. Esto conlleva una pérdida progresiva de las funciones del hígado, lo que genera numerosas complicaciones (tales como ascitis, hemorragias, hipertensión portal, fallo hepático o CHC) aumentando el riesgo de mortalidad de estos pacientes. Hasta la fecha, el trasplante de hígado es la única opción efectiva para aquellos pacientes que sufren de una cirrosis descompensada (24, 173).

Las HSC son las principales células responsables de la fibrosis hepática, ya que tras su activación, se convierten en las productoras mayoritarias de matriz extracelular (MEC). Sin embargo, no son las únicas que participan en este proceso, ya que hay otras células que también contribuyen al mismo (fibroblastos portales (especialmente en fibrosis biliar), células derivadas de la médula ósea (células madre mesenquimales y fibrocitos) y fibroblastos derivados de la transición epitelio-mesénquima (TEM)) (50, 147). Bajo condiciones fisiológicas, las HSC quiescentes (HSCq) residen en el compartimento perisinusoidal (también conocido como “espacio de Disse”) entre hepatocitos y células endoteliales sinusoidales, presentan una acumulación de vitamina A y participan en la regulación del flujo de sangre sinusoidal (49). Tras el daño hepático las HSC se activan por la acción de diversos estímulos, proliferando, liberando las gotas de retinoide (vitamina A) y diferenciándose en miofibroblastos activados (HSCa-MF), con características contráctiles y pro-inflamatorias. El aumento de la expresión de α -actina del músculo liso (α -SMA) y COL1A1 es una de sus características. También liberan inhibidores de tejido de metaloproteinasas 1 y 2 (TIMPs), que bloquean la acción de las metaloproteinasas de matriz (MMPs), promoviendo así la deposición de MEC (173).

1. Introducción

TGF- β 1 (factor de crecimiento transformador β 1) es una de las citoquinas más potentes que inducen la activación de las HSC y consecuentemente la fibrosis. Otras citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, como factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), TGF- α y factor de crecimiento de queratinocitos, también median este proceso. Por otro lado, el estrés oxidativo puede inducir muerte celular, infiltración inmune, esteatosis hepatocelular o actuar como un estimulador de las HSC, induciendo la fibrosis hepática. La apoptosis de los hepatocitos también presenta una gran importancia en el desarrollo de este proceso. Está mediada por diversos estímulos, entre los que se encuentran Fas y TNF- α . Por último, la inducción de estímulos pro-inflamatorios (TNF- α , IL-6, IL-1 β) promueve el reclutamiento de neutrófilos y células T, estimulando la actividad pro-fibrótica de las HSC (14, 173) (Figura 5).

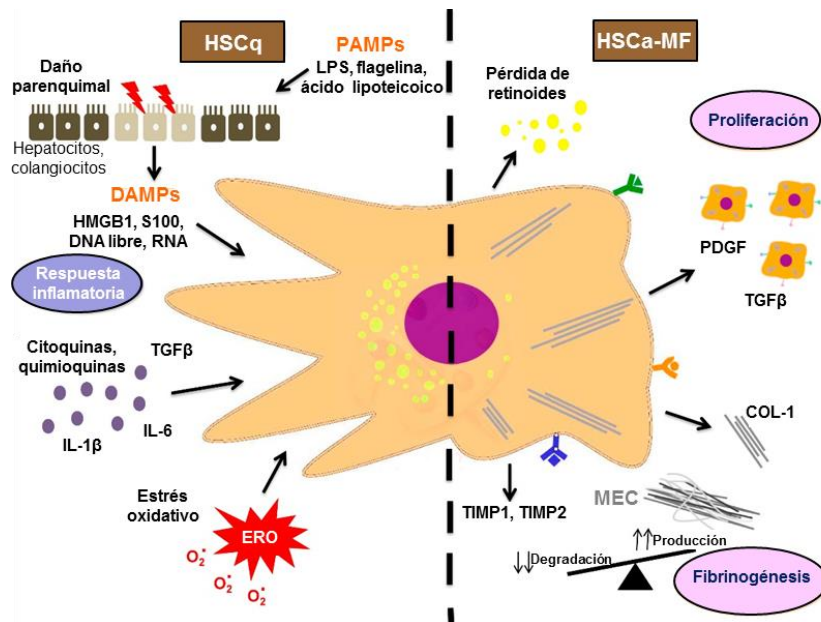


Figura 5. Papel de HSC en fibrogenesis hepática. Adaptado de Zoubek *et al.* (173).

La fibrosis hepática es un proceso potencialmente reversible. Los fundamentos de esta resolución dependen de: 1) que se elimine la causa inicial que causó el daño hepático; 2) la regresión del estado activado de los miofibroblastos y/o su eliminación (la apoptosis de las HSC ha demostrado tener una enorme importancia en este proceso); 3) la degradación del exceso de MEC y 4) una reducción de la inflamación. Las terapias anti-fibróticas se centran en llevar a cabo estos puntos, ya sea mediante modificaciones del estilo de vida, o mediante la utilización de diversos medicamentos. Al igual que en la

EHNA, todavía no se ha aprobado el uso de ninguno de estos compuestos, aunque muchos de ellos se encuentran en fases avanzadas de los ensayos clínicos (49, 173).

1.3.3. Papel de COX-2 en EHNA y fibrosis hepática.

Como ya se ha mencionado, el papel que presentan las PGs dependientes de COX-2 en el desarrollo de la EHNA y la fibrosis hepática es muy controvertido. Algunos trabajos indican que su efecto es beneficioso, previniendo la progresión de ambas patologías. Se ha visto que COX-2 inhibe el desarrollo de la fibrosis contrarrestando los efectos de varios factores de crecimiento y suprimiendo la proliferación de las HSC (65). También que el uso de inhibidores selectivos de COX-2, como celecoxib o NS-398, inducen la expresión de colágeno en HSC, mientras que PGE₂ la reduce (67, 68, 73). En cambio, otros estudios señalan que la acción de las prostaglandinas favorece el desarrollo de estas enfermedades, ya que han observado que meloxicam, celecoxib y NS-398 protegen frente a su desarrollo (78, 122, 169). Incluso hay un estudio en el que, tras utilizar un modelo de ratón transgénico para COX-2, afirman que COX-2 no media el desarrollo de la fibrosis hepática (170). En trabajos previos del grupo, se ha utilizado otro modelo de ratón Tg, portador del gen COX-2 humano en el hepatocito, y se ha observado que PGE₂ dependiente de COX-2 presenta un papel protector frente al daño hepático, esteatosis, obesidad y RI (20, 46, 107). Esto es debido a una mayor sensibilidad a la insulina y mayor tolerancia a la glucosa provocada por activación de AKT y AMPK (proteína quinasa activada por AMP), a una reducción de citoquinas pro-inflamatorias y de lípidos hepáticos y plasmáticos asociados a una mayor oxidación mitocondrial, y a un aumento del gasto energético e inducción de la termogénesis (46).

1.4. miARNs.

Los miARNs son moléculas de ARN monocatenario de 20-23 nucleótidos de longitud, cuya función consiste en regular la expresión génica a nivel post-transcripcional. Se descubrieron por primera vez en *Caenorhabditis elegans*, y su secuencia está altamente conservada entre animales, humanos, plantas y virus. Los miARNs maduros y las proteínas argonautas (Ago) forman el complejo silenciador inducido por ARN (RISC), un complejo de ribonucleoproteínas que media el silenciamiento génico post-transcripcional. La complementariedad de bases de la

1. Introducción

secuencia de los miARNs permite su unión a la región 3'UTR de los ARNm diana, dirigiendo así al complejo RISC hasta ellos. Una vez se ha producido esta unión, los ARNm son degradados, desestabilizados o inhibidos de forma traduccional por la proteína Ago. Cabe destacar que esta complementariedad es parcial, lo que permite que un único miARN pueda regular múltiples ARNm simultáneamente, o que múltiples miARNs regulen la expresión de un mismo ARNm (132, 162).

Su biogénesis comienza con la transcripción de los genes de los miARNs por la acción de las ARN polimerasas II o III, generando transcritos de miARN primario (pri-miARN). Los pri-miARNs tienen 3-4 Kb de longitud, y también pueden generarse a partir de la escisión de intrones procedentes de genes codificantes de proteínas. A continuación, los pri-miARNs se pliegan en horquillas, y son procesados por la acción de Drosha y Dicer, dos miembros de la familia de enzimas RNasa III. Drosha puede formar dos tipos de complejos: uno más pequeño, compuesto por la enzima Drosha y la proteína DiGeorge región crítica 8 (DGCR8), que procesa la mayoría de los pri-miARNs; y otro más grande, que también contiene varias clases de proteínas asociadas a ARN, que incluyen a helicasas de ARN (como p68/DDX5 y p72/DDX17), ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas y proteínas con motivos de unión o de reconocimiento de ARN (51). En primer lugar, el complejo Drosha actúa cortando los extremos 5' y 3' del pri-miARN. Esto genera un miARN precursor (pre-miARN) de aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, que es exportado al citoplasma mediante la acción de la exportina 5 (que forma un complejo con Ran-GTP). Ya en el citoplasma, el pre-miARN es procesado (escindido de nuevo) por Dicer, enzima que forma parte del complejo de carga RISC (RLC), junto a proteína de unión a ARN Tar (TRBP) y Ago2. El corte forma un dúplex de miARN de aproximadamente 21 nucleótidos de longitud. En algunos casos, donde los miARN presentan un elevado grado de complementariedad a lo largo de la horquilla, se produce un corte adicional en el medio del brazo 3' previo al procesamiento por Dicer. Esto ocurre por la acción de Ago2, generando el ac-pre-miARN. Dicer es capaz de procesar este precursor de la misma forma que al pre-miARN. Esto es solo un ejemplo de la complejidad del proceso, ya que no constituye una vía lineal y universal para todos los miARNs. Finalmente, una de las cadenas del dúplex formado representa al miARN maduro, que se unirá a Ago2 para formar el complejo RISC y ejercer su papel silenciador, mientras que la otra es liberada, y en muchos casos degradada. (43, 84, 162) (Figura 6).

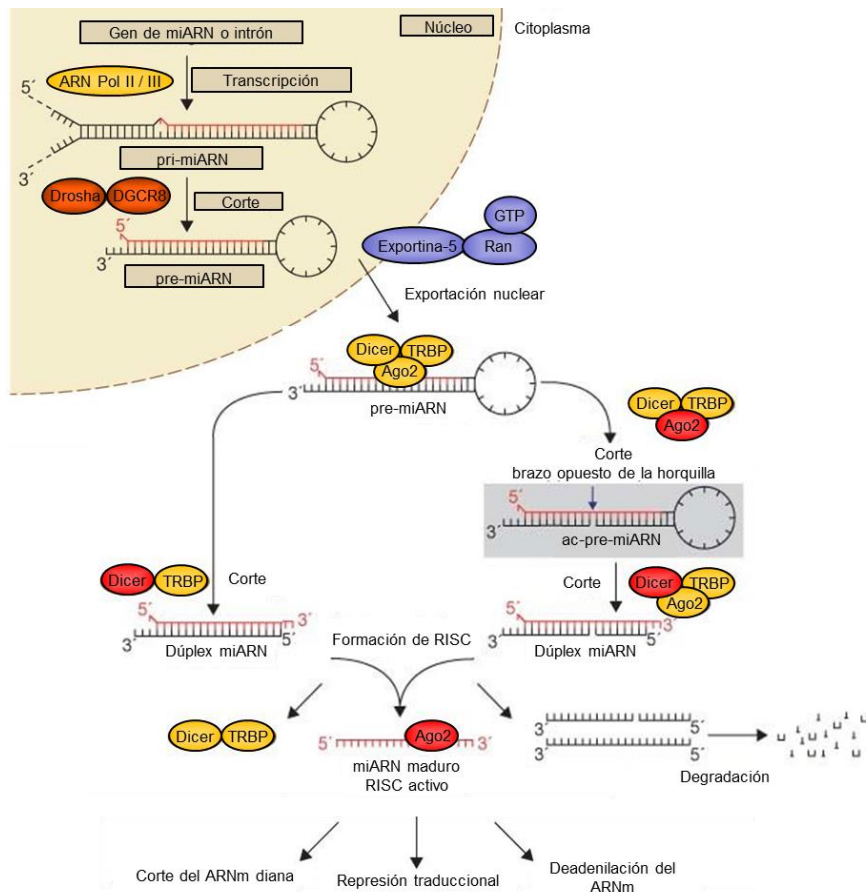


Figura 6. Vía de procesamiento de miARN. Adaptado de Winter *et al.* (162).

La expresión de los miARNs está controlada por un amplio rango de elementos reguladores, tanto a nivel transcripcional, como post-transcripcional. Respecto a la regulación transcripcional, las regiones promotoras de los genes codificantes de miARNs son muy similares a las de los genes codificantes de proteínas. Por tanto, también son controladas de forma similar, mediante factores de transcripción, potenciadores, elementos silenciadores y modificaciones de la cromatina. Por ejemplo, los factores de transcripción MyoD, Mef2 y SRF determinan que la expresión de miR-1 sea específica del corazón (118). Por su parte, las modificaciones post-transcripcionales son muy variadas. Implican la participación de numerosas proteínas accesorias, que regulan el procesamiento mediante su unión a Droscha, Dicer o a los precursores de miARNs, por ejemplo, Lin-28 (que actúa como un regulador negativo de pri-let-7, bloqueando su procesamiento por Droscha) o p68 y p72. Estas últimas pueden actuar como factores de especificidad para el procesamiento de algunos miARNs. Por otro lado, ambos componentes del complejo Droscha pueden regularse entre sí. DGCR8 estabiliza a Droscha interaccionando con su dominio intermedio, mientras que Droscha controla los niveles de DGCR8, induciendo su degradación. Algo similar ocurre en el complejo RLC, ya que

TRBP estabiliza a Dicer. Además, TRBP facilita su actuación sobre el pre-miARN, a pesar de que no sea esencial para la misma. También se han observado cambios en la secuencia de los miARN (“edición de miARNs”), que consisten en la conversión/desaminación de una adenosina en una inosina, alterando las propiedades estructurales del transcrito. Esto puede ocurrir tanto en el núcleo, como en el citoplasma, tanto en el pri-miARN, como en el pre-miARN. El proceso de edición de miARNs no implica solo una alteración en el procesamiento de los miARNs, sino también modificaciones en la especificidad de su ARNm diana (84, 162).

1.4.1. Papel de miARNs en fibrosis hepática.

Los miARNs presentan un papel esencial en numerosos procesos biológicos, tales como el crecimiento celular, diferenciación, desarrollo, metabolismo, apoptosis, inflamación, secreción, etc. Alteraciones en sus niveles de expresión se han relacionado con enfermedades como cáncer, diabetes, asma, enfermedades cardiovasculares, desórdenes del sistema nervioso, etc. Su papel en las enfermedades hepáticas es muy relevante, ya que se han observado diferencias en la expresión de los miARNs en pacientes con EHGNA, fibrosis, cirrosis y CHC, o en la proliferación de los hepatocitos durante la regeneración hepática (28, 43, 130, 132). Sin embargo, todavía se conoce muy poco sobre las funciones específicas de muchos de estos miARNs, siendo necesario analizar su implicación en los diferentes procesos biológicos y patologías existentes. Entre los que se han estudiado en profundidad se encuentra miR-122, que es el miARN hepático más abundante y su papel es clave en la regulación del metabolismo de lípidos y ácidos grasos y en la acumulación del colesterol. Se ha observado que ratones deficientes en este miARN presentan inflamación hepática, fibrosis e incluso CHC. miR-33a es importante en la síntesis de ácidos biliares, oxidación de ácidos grasos y homeostasis del colesterol. En concreto, su expresión aumenta al disminuir los niveles de colesterol (43).

Respecto a la fibrosis hepática, existen varias familias de miARNs cuyo rol se ha estudiado en profundidad, y juegan un papel pro- o anti-fibrótico en base a su implicación en el desarrollo de la fibrosis y la activación de las HSC. La familia de miR-29 induce la apoptosis de las HSC modulando la vía de señalización de PI3K/AKT y disminuye la acumulación de MEC. Sus efectos anti-fibróticos están muy estudiados, y se han confirmado en hígado, riñón y otros órganos (72). Además, la activación de las HSC

inhibe su expresión, aumentando la producción de MEC (130). La familia de miR-34 promueve la progresión de la fibrosis induciendo la activación de las HSC, mientras que la familia de miR-378 la inhibe. Los miembros de la familia de miR-15, pueden tanto promover la proliferación de las HSC (pues tienen un efecto positivo en la vía de señalización de TGF- β 1), como inducir su apoptosis (regulando negativamente la vía de señalización de PI3K/AKT). Finalmente, las familias de miR-199 y miR-200 son responsables de la deposición de MEC y la liberación de citoquinas pro-fibróticas. Por ejemplo, la sobreexpresión de miR-199a aumenta los niveles de MMP13, TIMP1 y α 1 procolágeno (72). Ambas familias se consideran los principales miARNs asociados a la regulación de la fibrosis hepática (62). Su acción pro-fibrótica es bien conocida, pues no solo se pone de manifiesto en modelos animales, sino también en el hígado de pacientes con fibrosis, o hepatitis C crónica (132).

1.4.2. Relación entre miARNs y COX-2.

Además de estar regulada a nivel transcripcional por los diferentes elementos reguladores presentes en su región promotora, la expresión de COX-2 también puede ser regulada a nivel post-transcripcional, a través de cambios en la estabilidad de su ARNm. Estos cambios se producen en la región 3'UTR de COX-2, que contiene múltiples copias de elementos ricos en AU (ERAs) y de elementos de respuesta a miARNs (ERM). La presencia de factores de unión a ERA, miARNs específicos a estos elementos o una poliadenilación alternativa (proximal o distal) en la región 3'UTR repercute sobre la estabilidad y la eficiencia traduccional de COX-2 (60).

La existencia de una relación entre la expresión de COX-2 y miARNs se ha documentado en varios estudios. COX-2 es crítica para la implantación embrionaria. En el trabajo de Chakrabarty *et al.* (23) comprobaron que durante este proceso la expresión espaciotemporal de miR-101a y miR-199a* coincidía con la expresión de COX-2 en el útero de los ratones. Además, demostraron que ambos miARN interactúan con la región 3'UTR de COX-2 *in vitro*, lo que lleva a su represión traduccional. Por tanto, se puede afirmar que COX-2 es una diana directa de miR-101a y miR-199a*, que regulan su expresión no solo durante la implantación embrionaria, sino también en el cáncer endometrial; y en el caso de miR-101, además en el cáncer gástrico (36, 63). miR-137 y miR-26b presentan un papel anti-tumoral, suprimiendo la proliferación y la invasión de las células de glioblastoma humano. Para ello, utilizando ensayos de luciferasa, en ambos

casos se ha observado que estos miARNs inhiben la expresión de COX-2 (27, 71). También se ha visto que miR-137 ejerce sus efectos anti-tumorales inhibiendo COX-2 en cáncer gástrico, suprimiendo así la activación de la vía de señalización PI3K/AKT (31). Por otro lado, miR-143 refleja su efecto anti-tumoral disminuyendo el crecimiento y migración de las células del carcinoma de vejiga humano (T24), a través de la inhibición de COX-2, consecuencia de la sobreexpresión de este miARN en estas células (145). Además, en un estudio anterior del grupo, se determinó que COX-2 es una diana de miR-16 en células humanas de hepatoma. miR-16 inhibe su expresión uniéndose directamente al ERM presente en la región 3'UTR de COX-2 o reduciendo los niveles de HuR, una proteína de unión a ARN. Con ello se reduce la capacidad de estas células para desarrollar tumores en ratones, inhibiendo la proliferación celular y promoviendo la apoptosis (1). Sin embargo, a pesar de toda esta información se conoce poco sobre los efectos de COX-2 en el patrón de expresión de los miARNs. En un estudio realizado por el grupo de Wu (100), observaron que miR-21 actúa sobre 15-PGDH (con efecto anti-tumoral), evitando así la degradación de PGE₂ y promoviendo el crecimiento del colangiocarcinoma humano. Por otra parte, el grupo de Lala (102) comprobó que la sobreexpresión de COX-2 en el cáncer de mama induce la expresión del miARN oncogénico miR-526b, implicado en la progresión de esta enfermedad. Respecto a su papel en la fisiopatología hepática, en un trabajo previo del grupo se observó que COX-2 es capaz de regular el procesamiento de miR-23b, miR-146b y miR-183 implicados en la señalización de la insulina en el hígado. En concreto, COX-2 protege frente a la RI. Para ello disminuye los niveles de miR-183 en las células hepáticas incrementando los niveles de la helicasa p68 (DDX5) vía PI3K/p300, lo que aumenta los niveles de IRS1 (sustrato del receptor de insulina 1) (113).

2. Objetivos

- **Estudiar la contribución de PGE₂ dependiente de COX-2 al desarrollo de la EHNA y fibrosis hepática en modelos murinos.**
- **Evaluar el patrón de expresión de miARNs hepáticos en las líneas transgénicas para COX-2, y su papel en el desarrollo y evolución de la fibrosis hepática.**
- **Analizar la expresión de COX-2 y los niveles de PGE₂ en biopsias hepáticas y sueros de pacientes con EHGNA y fibrosis. Relación con el progreso de la enfermedad.**

3. Materiales y métodos

3.1. Reactivos.

Los anticuerpos se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EEUU), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU), Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EEUU), Abcam (Cambridge, Reino Unido), Calbiochem/Merck Millipore (Billerica, Massachusetts, EEUU), Ambion/Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EEUU), BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, EEUU) y Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, EEUU). PGE₂ procede de Cayman Chemical, hTGF-β1 de Roche Diagnostics (Indianapolis, Indiana, EEUU) y el inhibidor farmacológico DFU de Merck (Kenilworth, NJ, EEUU). El resto de reactivos se adquirieron a través de Merck, Roche Diagnostics, Cayman Chemical, Sigma-Aldrich o BD Pharmingen (Fallbrook, CA, EEUU). Los reactivos utilizados para la electroforesis y el Western Blot (WB) se obtuvieron de Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU). Las placas para cultivos celulares se adquirieron a través de Falcon (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, EEUU), y los medios de cultivo celular proceden de Gibco (Life Technologies™, Carlsbad, CA, EEUU).

3.2. Pacientes.

Se realizaron dos estudios. En el primero, se incluyeron 34 pacientes con colelitiasis asintomática a los que se les realizó una biopsia hepática durante una colecistectomía laparoscópica programada (hígado normal, HN) y 49 pacientes con un diagnóstico clínico de EHGNA, 26 con ENA y 23 con EHNA. En el segundo, se incluyeron 13 pacientes con un HN y 25 pacientes con un diagnóstico clínico de EHGNA, agrupados según su grado de fibrosis. A todos se les sometió a una biopsia hepática para el diagnóstico. Los criterios de inclusión de estos pacientes se basaron en una ingestión de alcohol menor de 20g/día, la presencia de esteatosis con o sin necroinflamación y/o fibrosis, y la ausencia de infección con el virus de la hepatitis B y/o C, o el virus de la inmunodeficiencia humana. Los estudios se realizaron de acuerdo a la Declaración de Helsinki de 1975 y a las leyes nacionales y locales. El comité de ética humana del Hospital Universitario Santa Cristina, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa aprobó los procedimientos del estudio, obteniendo el consentimiento informado de todos los pacientes antes de su inclusión en el mismo.

3.3. Evaluación histopatológica de los pacientes.

Las secciones del hígado embebido en parafina se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (H&E) y la tinción Tricrómica de Masson (MTC), y fueron examinadas e interpretadas por un patólogo experimentado (C. G-M) que no conocía los datos clínicos. Se utilizó el sistema de evaluación histológica de Kleiner (80) para determinar el índice de actividad histológica de la enfermedad hepática grasa no alcohólica (índice de actividad EHGNA), así como el grado de fibrosis de los pacientes. Los grados de esteatosis de los hepatocitos se dividen en: 0, <5%; 1, 5-33%; 2, >33-66%; y 3, >66%. La inflamación lobular se divide en: 0, sin focos; 1, <2 focos por cada campo a 200X; 2, 2-4 focos por cada campo a 200X; y 3, >4 focos por cada campo a 200X. El “ballooning” se clasifica como 0, nada; 1, pocas células redondeadas; y 2, muchas células redondeadas. Por su parte, los grados de fibrosis se dividen en 0, nada; 1, perisinusoidal o periportal; 2, perisinusoidal y portal/periportal; 3, fibrosis en puente; y 4, cirrosis. El índice de actividad EHGNA se calculó en base al conjunto de los grados de esteatosis, inflamación lobular y “ballooning” de los hepatocitos.

El análisis de miARNs en suero fue realizado por el Grupo de Biomarcadores y Dianas Terapéuticas del Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS).

3.4. Experimentación animal.

Los ratones (tanto los hCOX-2-Tg, como sus hermanos de genotipo salvaje (*wild-type*, Wt) se generaron por el apareamiento sistemático de ratones heterocigotos B6D2-Tg (APOE-PTGS2/4) Upme, que expresan 55 copias del transgén, con ratones Wt B6D2F1/OlaHsd, durante más de siete generaciones. Los ratones hCOX-2-Tg son fenotípicamente similares a sus hermanos Wt y no presentaron cambios histológicos detectables en el hígado a las 12 semanas (sem.) de edad. La integración del transgén se comprobó mediante análisis por PCR del ADN (ácido desoxirribonucleico) genómico de las colas de los animales. Los ratones hCOX-2-Tg expresan el gen COX-2 de origen humano de forma constitutiva en el hepatocito, bajo el control del promotor de ApoE humano y su región específica de control hepático (HCR). Esta región HCR es un dominio regulador único que controla la expresión de ApoE en el hígado (20), y se encuentra ausente en otros tipos celulares, como los macrófagos (que cuentan con las regiones

reguladoras ME.2 y ME.1), lo que limita su expresión específicamente al hepatocito (152).

Los ratones Wt y hCOX-2-Tg se mantuvieron en ciclos de 12 horas de luz/oscuridad, a una temperatura de 22°C, en salas con control de humedad y con libre acceso al agua de bebida. Se les proporcionó una dieta normal RCD (dieta control; SAFE A04-10 Panlab, Barcelona) o una dieta MCD; TD-90262 Harland-Tecklad, Indianapolis, IN) durante 2 o 4 sem. (modelo para inducir EHNA). A algunos ratones (n=6) se les trató con la dieta MCD durante 4 sem. y después con la dieta RCD durante 5 días más, estableciendo un modelo de recuperación (R). Durante el tratamiento con la dieta MCD, se midieron el peso corporal y la cantidad de comida ingerida cada dos días. Para inducir fibrosis, se les inyectó intraperitonealmente (i.p.) una dosis de 1.6 ml/kg de CCl₄ (Sigma-Aldrich, diluido a 1:4 en aceite de oliva (Oil)), dos veces por sem. Los animales control se inyectaron i.p. con Oil. En otra aproximación para inducir fibrosis, se sometió a algunos animales a BDL durante 21 días. Los animales se sacrificaron en 2 sem., 4 sem. y 4 sem. + R tras la dieta MCD; 9 sem. tras el tratamiento con CCl₄ o 21 días tras BDL. El hígado se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C para posteriormente realizar análisis de proteína o ARNm, o se fijó en formalina al 4% para realizar bloques de parafina. El plasma se obtuvo del seno retro-orbital o de la vena cava inferior.

Toda la experimentación con animales se llevó a cabo de acuerdo con las recomendaciones de las Asociaciones de la Federación Europea de la Ciencia del Animal de Laboratorio (FELASA) sobre la vigilancia de la salud, la ley de Derecho Comunitario Europeo (86/609/EEC) y la ley española (R.D.1201/2005). El Comité Ético de la Comisión Bioética del CSIC, España, aprobó el uso de animales en los procedimientos experimentales.

3.5. Evaluación histopatológica de los animales.

Las secciones del hígado embebido en parafina se tiñeron con H&E y MTC, y fueron examinadas e interpretadas por un patólogo experimentado (J. V-C) que no conocía las características de los animales. El índice de actividad EHGNA y el grado de fibrosis se determinaron utilizando el sistema de evaluación histológica para modelos animales validado por Liang *et al.* (93). Los grados de esteatosis de los hepatocitos se dividen en: 0, <5%; 1, 5-33%; 2, >33-66%; y 3, >66%. La inflamación lobular se divide

en: 0, sin focos (<0.5 focos); 1, 0.5-1 focos; 2, 1-2 focos; y 3, >2 focos. El “ballooning” se clasifica como 0, nada; 1, pocas células redondeadas; y 2, muchas células redondeadas. Por su parte, los grados de fibrosis se dividen en 0, nada; 1, perisinusoidal y/o pericentral; 2, fibrosis central/central incompleta; 3, fibrosis central/central completa; y 4, cirrosis. Al igual que en los pacientes, el índice de actividad EHGNA se calculó en base al conjunto de los grados de esteatosis, inflamación lobular y “ballooning”.

El análisis cuantitativo de colágeno en las secciones teñidas con Rojo Sirio se realizó utilizando un programa de análisis de imagen (*ImageJ* (<http://imagej.nih.gov>)). Se tiñeron secciones de parafina del hígado de 20 μm de espesor con rojo Sirio al 0,1% en ácido pícrico saturado. El área teñida de rojo (μm^2) se midió en cinco campos consecutivos (40X). El porcentaje del área fibrótica se calculó en base al área total examinada.

3.6. Aislamiento y cultivo de hepatocitos.

Los hepatocitos de los ratones Wt y hCOX-2-Tg se aislaron por perfusión a través de la vena cava inferior, utilizando una solución de HBSS (Solución Balanceada de Hank; Gibco), 10 mM HEPES pH 7.4, 0.2 mM EGTA, 500U heparina y medio William’s E (Sigma) con 0.56 mg/ml colagenasa tipo 1 (C5138-1G, Sigma, la concentración aumenta 1.5 veces tras el tratamiento con CCl_4). Las células se filtraron (filtro de 100 μm) y se centrifugaron a 500 rpm, 4°C, 5 minutos. Tras esto, se resuspendieron en un medio de cultivo AM (medio de adhesión) compuesto por: DMEM/F12 (1:1), 20 mM HEPES pH 7.4, 0.05% NaHCO_3 , 6 mM glucosa, 10% FBS (suero bovino fetal, Sigma), 5 mg/ml BSA (albúmina de suero bovina), 100 U/ml penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ estreptomycin y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicina; y se purificaron con una centrifugación por gradiente de densidad, utilizando una solución isotónica de Percoll (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia), 150 mM NaCl y 1X HBSS. Finalmente, tras lavar las células 2-3 veces con AM (500 rpm, 5 minutos a 4°C), se resuspendieron directamente en 700 μl QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Valencia, CA) para el posterior análisis de su ARN (ARN total y miARNs), o se sembraron 500,000 células/pocillo en AM al 10% FBS en placas de 6 pocillos. La viabilidad celular se analizó por exclusión con Trypan blue. El sobrenadante de los hepatocitos (medio condicionado de los hepatocitos) se recogió tras 6, 18 y 24 horas de cultivo y se guardó a -80°C para su análisis. Por otro lado, los hepatocitos se

sometieron a un “starving” de 4 horas (reduciendo el FBS al 2%) y se trataron 16 horas/toda la noche (TN) con PGE₂ 5 μM, TGF-β1 2 ng/ml o DFU 5 μM.

3.7. Aislamiento de células de Kupffer.

Para aislar células de Kupffer, se utilizó el sobrenadante de la primera centrifugación del protocolo de aislamiento de hepatocitos, que se centrifugó a 500 rpm, 5 minutos a 4°C para descartar los hepatocitos restantes (123). Tras esto, el sobrenadante se centrifugó a 1500 rpm, 10 minutos a 4°C, y el pellet (con las células de Kupffer) se resuspendió en medio AM. Las células se mezclaron por inversión con Percoll al 50% en 1X HBSS y se centrifugaron a 2300 rpm, 30 minutos sin aceleración ni freno a temperatura ambiente. Finalmente, el pellet de células de Kupffer se lavó con PBS, centrifugando dos veces a 1500 rpm, 10 minutos a 4°C para lavar los restos de la solución de Percoll. Las células se resuspendieron directamente en 700 μl QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) o 1 ml TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) (ARN total) para el posterior análisis de su ARN.

3.8. Aislamiento y cultivo de HSC.

El aislamiento de HSC se realizó como lo describen Mederacke *et al.* (108). El procedimiento consiste en: Perfusión *in situ* del hígado de los ratones con pronasa (0.4 mg/ml) en solución de perfusión (1X HBSS, 10 mM HEPES pH 7.4, 0.2 mM EGTA, 500U heparina) y colagenasa (0.56 mg/ml, aumentando 1.5 veces la concentración tras el tratamiento con CCl₄) en medio William’s E; su digestión *in vitro*; y la separación de las HSC del resto de las poblaciones hepáticas en base a un gradiente de densidad. Tras la perfusión *in situ*, el hígado se disgregó en condiciones estériles. Después se digirió *in vitro* con una solución precalentada de 0.5 mg/ml pronasa, 0.4 mg/ml colagenasa, 0.1 mg/ml DNasa I y 10 mM HEPES pH 7.4 en 1X HBSS. La suspensión celular se filtró (filtro de 100 μm) para eliminar los restos no digeridos del tejido, y se centrifugó a 1900 rpm, 10 minutos a 4°C. El pellet de las células no parenquimales se resuspendió en GBSS (Sigma) y se purificó con una centrifugación por gradiente de densidad utilizando 14% Nycodenz (Sigma). Las HSC se obtuvieron de la capa blanca difusa de la interfase, y se centrifugaron dos veces en una solución de 1X PBS/0.3% BSA a 1900 rpm, 5 minutos a

4°C. Finalmente, las células se resuspendieron directamente en 700 µl QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) o 1 ml TRIzol reagent (Invitrogen) para el posterior análisis de su ARN, o se sembraron en placas de 6 o 12 pocillos (Corning, Nueva York, EEUU) en medio DMEM (Medio de cultivo de Dulbecco, Gibco), 20% FBS, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina y 50 µg/ml gentamicina. Las células se cultivaron durante 0, 1 y 3 días, para posteriores análisis de ARN y proteínas. Se estableció una línea celular primaria de HSC de los ratones Wt por inmortalización espontánea.

3.9. Aislamiento de NPCs para su análisis por citometría de flujo.

Las NPCs se aislaron como describen Sanz-García *et al.* (135). El hígado se extrajo en 1X HBSS a temperatura ambiente, se disgregó y se filtró (filtro de 100 µm). Después se centrifugó a 1700 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente, y el pellet de células se resuspendió en una solución al 36% de Percoll en 1X HBSS. Tras centrifugar a 2200 rpm, 20 minutos sin freno a temperatura ambiente, los eritrocitos se lisaron incubándolos 10 minutos a temperatura ambiente con una solución de 139 mM NH₄Cl, 19 mM Tris-HCl pH 7.2. El pellet se lavó dos veces con 5 ml de 1X HBSS frío, se centrifugó a 1700 rpm, 5 minutos a 4°C y las células se resuspendieron en 100 µl de 1X HBSS.

3.10. Citometría de flujo.

Las NPCs aisladas (0.3-0.5 x 10⁶ células/test) se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con los siguientes anticuerpos (5 µg/ml): CD11b-Mac1-PECy7 (*rat IgG2bk*, anti-mouse eBioscience, San Diego, CA, EEUU), CD45-FITC (*rat IgG*, Beckman), F4/80-PE (*rat IgG2ak*, eBioscience), Ly6C-FITC (*rat IgMk*, anti-mouse, Pharmingen, San José, CA, EEUU) y CCR2-APC (*rat IgG2B*, R&DSYSTEMS, Minneapolis, MN, EEUU); o sus correspondientes controles de isotipo. Tras lavar se añadieron esferas de calibración (*Perfect-Count microspheres*, Cytognos, Salamanca, España) para cuantificar el número exacto de células. El análisis por citometría de flujo se realizó utilizando el Cytomics FC500 con el programa CXP.

3.11. Cultivos de líneas celulares de esteladas hepáticas.

La línea celular de esteladas hepáticas humanas LX-2 se adquirió de Millipore, Billerica, MA, SCC064. La línea celular de esteladas hepáticas murinas GRX se compró al Banco de Células de Río de Janeiro BCRJ 0094. Ambas líneas celulares se han autenticado en el servicio de genómica del IIB, con el Sistema Promega's StemElite™ ID. Las células LX-2 se mantuvieron en un medio EmbryoMAX (Millipore, Billerica, MA, EEUU) suplementado con glutamina al 2% de FBS. Las células GRX se mantuvieron en un medio DMEM al 5% FBS. También se utilizaron las HSC primarias aisladas de los ratones Wt, que se mantuvieron en un medio DMEM al 10% FBS. Todas estas células se cultivaron en una atmósfera humidificada al 5% CO₂, 37°C. Para los experimentos, las células se sembraron en placas de 6 (4x10⁵ células/pocillo para LX-2 y GRX; 1,5x10⁵ células/pocillo para HSC primarias) o 12 (15x10⁴ células/pocillo para LX-2 y GRX; 6x10⁴ células/pocillo para HSC primarias) pocillos, se les retiró el FBS y se trataron con PGE₂ 5 μM (TN), TGF-β1 2 ng/ml (6 horas) o 3 μM inhibidor TβR-I (LY364947, Calbiochem/Merck Millipore) (1 hora, solo a HSC primarias). Por otro lado, a las células LX-2 se les retiró el FBS 6 horas, y se las trató con PGE₂ 5 μM y diversos inhibidores farmacológicos (20 μM LY294002, 1 μM Gö6983, 0.4 μM CMI, 0.5 μM BRIB796, 50 μM PD98059 y 10 μM BAY11-7085) o antagonistas de los receptores EP (1 μM Ant. EP2 (TG4-155) y 25 μM Ant. EP4 (GW627368X)) durante 12 horas. Por su parte, a las HSC primarias se las trató durante 24 horas con el medio condicionado de los hepatocitos aislados (de los ratones Wt y hCOX-2-Tg tras el tratamiento con Oil o CCl₄).

3.12. Determinación de metabolitos, citoquinas y hormonas, y ensayo del MTT.

Los niveles de PGE₂ se midieron en el medio condicionado de los hepatocitos aislados, el tejido hepático de los ratones, y el suero de los pacientes con un inmunoensayo específico (*DetectX Prostaglandin E₂ Enzyme Immunoassay Kit*; Arbor Assays (Ann Arbor, MI, EEUU)). Los niveles de glucosa en sangre se analizaron con un Glucómetro Accu-Check (Roche). La actividad de las transaminasas ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato transaminasa), y la cantidad de bilirrubina total en plasma se determinaron utilizando tiras Reflotron (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain). La cantidad de TGs, colesterol y HDL (lipoproteínas de alta densidad) en plasma se midieron con kits específicos de BioSystems (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany). Los niveles de

citoquinas en plasma se evaluaron con el *Luminex 100IS Multiparametric Analyzer*, en el servicio de citometría de flujo del Centro Nacional de Biotecnología, Madrid. Para cuantificar colágeno, se midió el contenido de hidroxiprolina hepática utilizando un kit (*Hydroxiprolin Assay Kit*, Sigma). La actividad de caspasa-3 y 8 se determinó mediante fluorescencia, con sustratos específicos (*Caspase-3/8 Fluorogenic Substrate*, BD Pharmingen), y se representó en unidades arbitrarias. Todos estos análisis se realizaron según las instrucciones de los fabricantes.

Para los ensayos de MTT (*Thiazol Blue Tetrazolium Blue*), las células se sembraron en placas de 96 pocillos (8×10^3 células/pocillo). Tras agregarles los correspondientes estímulos, se lavaron con 1X PBS y se les añadió 100 μ l de medio completo. Después, se agregaron 20 μ l de 2 mg/ml MTT, y se incubaron 4 horas a 37°C en oscuridad. Finalmente, se añadieron 100 μ l DMSO, y se midió la absorbancia a 570 y 630 nm.

3.13. Medida del estado redox intracelular.

La sonda fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (H_2DCFDA , DCFH-DA, DCFH) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), sensible a la oxidación, se utilizó *in vitro* para analizar el estado redox intracelular (48). Tras los tratamientos correspondientes, las células se incubaron con 5 μ M H_2DCFDA (30 minutos, 37°C), se lavaron, se lisaron con un buffer compuesto por: 25 mM HEPES pH 7.5, 60 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EDTA y 0.1% Tritón X-100 (10 minutos, 4°C), y se transfirieron por duplicado a una placa de 96 pocillos. La fluorescencia se midió y se corrigió en base al contenido de proteína.

Los niveles de peroxidación de lípidos (LPO) se determinaron como una medida indirecta de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Se utilizó la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) según el método de Ohkawa *et al.* (47, 121), para cuantificar *ex vivo* la cantidad de productos aldehído generada por la LPO en el tejido hepático. Los extractos del hígado (30 mg) se homogeneizaron con 300 μ l de 0.15 M KCl. De estos, se incubaron 50 μ l durante 60 minutos a 95°C con 0.3% TBA pH 3-3.5, 0.5% SDS y 7.5% ácido acético, y tras esto se centrifugó a 6000 rpm, 10 minutos. La cantidad de especies reactivas al TBA (TBARS) se expresó en términos de malondialdehído (MDA), utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) como estándar (nmol MDA/mg proteína).

El glutatión total (GSht) y el oxidado (GSSG) se determinaron en los homogeneizados del hígado total, según el protocolo descrito por Tietze (151), con ligeras modificaciones. El contenido de GSH y GSSG intracelular se determinó con un ensayo basado en la reducción del DTNB (5,5'-ditio-*bis*-2-(ácido nitrobenzoico)) catalizada por la glutatión reductasa, descrito previamente (155). El lisado hepático se precipitó añadiendo 5-ácido sulfosalicílico (SSA) al 10%, y se centrifugó a 10000 rpm, 5 minutos. El sobrenadante obtenido se recogió para medir el contenido de GSht y GSSG. Para determinar el nivel de GSSG del lisado, primero se añadió 2-vinilpiridina, y luego se mantuvo una hora a 37°C para obtenerlo.

3.14. Ensayos de inmunofluorescencia.

Las HSC primarias (5×10^3) se sembraron en placas para inmunofluorescencia (Culture Slides, Falcon, Ref. 354108). Tras añadir los estímulos correspondientes, las células se lavaron con 1X PBS y se fijaron 10 minutos con paraformaldehído al 2%, a temperatura ambiente. Después, se lavaron con 1X PBS, y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% en 1X PBS 3 minutos a temperatura ambiente. Tras bloquear con 2% BSA 30 minutos a temperatura ambiente, las células se incubaron TN a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes (diluidos a 1:500 en 1X PBS 2% BSA) (Tabla IV). Al día siguiente, las células se lavaron varias veces y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromo (Invitrogen) 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad (diluidos 1:500 en 1X PBS 2% BSA). A continuación, se trataron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, diluido 1:1000 en 1X PBS 2% BSA) 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se desmontaron las placas, dejando al descubierto los portaobjetos para el microscopio. Los cubreobjetos se montaron con Prolong (Thermo Fisher Scientific). Tras 24 horas, las imágenes se adquirieron en el Confocal Leica TCS SP5 X.

3.15. Ensayos de inmunohistoquímica fluorescente.

Los hígados se fijaron TN en formalina al 4%. Tras embeber las muestras en parafina, se realizaron secciones de 5 μm de espesor, que más tarde se desparafinaron, se hidrataron y se sometieron a una “recuperación de antígeno” inducida por calor. La tinción inmunofluorescente se realizó utilizando técnicas estándar. La recuperación de

antígeno se realizó con citrato de sodio (10 mmol/l, pH 6), calentando en el microondas durante 3-10 minutos, seguido de una incubación de 2 horas con 10% suero de cabra, 1% albúmina en TBS 1X. Estas secciones se incubaron TN a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes (α -SMA, COL1A1 (Tabla IV)) diluidos a 1:300. A continuación, las secciones se lavaron y se incubaron con anticuerpos secundarios universales (1:500) y DAPI (1:1000) durante 1 hora. Finalmente, las secciones se montaron utilizando Prolong, y las imágenes se obtuvieron con un microscopio Confocal Leica TCS SP5 X.

3.16. Análisis del ciclo celular.

Las HSC primarias se trataron durante 24 horas con el medio condicionado de los hepatocitos aislados. Tras esto, se recogió el sobrenadante junto a las células. Las células se lavaron con 1X PBS, se centrifugaron a 1200 rpm, 5 minutos, y a continuación se fijaron con 700 μ l de etanol al 70% congelado 1 h a 4°C en agitación. Después, se centrifugaron y se resuspendieron en 1X PBS tres veces, para eliminar los residuos de etanol. Finalmente, las células se resuspendieron en 200 μ l 1X PBS, que contenía 0.02 μ g/ μ l yoduro de propidio y 0.1 μ g/ μ l ARNasa A, durante 1 hora en agitación y oscuridad. El análisis por citometría de flujo se realizó con el Cytomics FC500.

3.17. Análisis por *microarray* de miARNs.

Los miARNs se extrajeron de HSC aisladas procedentes de 26 ratones Wt y 21 hCOX-2-Tg tras un tratamiento con Oil o CCl₄ (9 Wt Oil, 17 Wt CCl₄, 9 hCOX-2-Tg Oil y 12 hCOX-2-Tg CCl₄). Se prepararon 3 *pools* (con un mínimo de 3 muestras de HSC aisladas por grupo) por cada condición experimental.

Para la extracción de los miARNs se utilizó *QIAzol Lysis Reagent* (Qiagen, Valencia, CA), y se purificaron con un *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen). La calidad e integridad de estos miARNs se evaluó en un Bioanalizador Agilent. Para el análisis del *array* de miARNs, se utilizó *miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, 4x Mouse & Rat panel I+II* (Exiqon). Estas placas de PCR de 384 pocillos contienen conjuntos de primer pre-alicuotados, y permiten el estudio de 748 miARNs de ratón y rata y 6 genes de referencia.

Para la síntesis de ADNc (ADN complementario), el ARN (20 ng) se poliadeniló y se retrotranscribió a ADNc utilizando un Kit: *Universal cDNA Synthesis Kit II* (parte de *miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR*; Exiqon). La PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) del ADNc (diluido 80 veces) se realizó con *ExiLENT SYBR[®] Green master mix* (Exiqon) y las placas de PCR de 384 pocillos, en un equipo de Life Technologies (*7900HT Fast-Real Time PCR System*). Los parámetros del termociclador fueron 10 minutos a 95°C; 40 ciclos de 10 segundos a 95°C; y 1 minuto a 60°C; seguidos de una curva de disociación consistente en 15 segundos a 95°C; 15 segundos a 60°C; y 15 segundos a 95°C. Los datos se normalizaron con el método de la normalización de la media global. Se determinó el cambio en el nivel de expresión de cada miARN comparando sus valores en los ratones hCOX-2-Tg frente a los Wt. El análisis de datos se realizó con los programas GenEx2.0 y Excel. Los “*Heatmaps*” y la agrupación de los genes expresados de forma diferencial se construyeron en Excel.

Los datos del *microarray* se validaron por RT-PCR, analizando individualmente los miARNs elegidos. El análisis de sus vías de señalización, redes y genes diana se realizó con las plataformas *miWalk* y *DAVID: Functional Annotation Tools* (base de datos para anotación, visualización y descubrimiento integrado). Esto permitió la identificación de varias vías de señalización candidatas para localizar los genes diana de estos miARNs, que se representaron utilizando la base de datos KEGG (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto). El programa *Cytoscape* se utilizó para ilustrar la superposición de esos posibles genes diana.

3.18. Extracción de ARN y análisis por RT-PCR.

Se realizaron dos extracciones diferentes. El ARN total de las muestras de hígado y células se extrajo utilizando *TRIzol reagent*. En este caso, el ARN total (1 µg) se retrotranscribió utilizando el kit: *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche). Para extraer ARN total junto a los miARNs se utilizaron 700 µl *QIAzol Lysis Reagent*, y se purificaron con un *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen). Para este caso, en la retrotranscripción se utilizaron los kits indicados a continuación, diferentes según se tratara de ARN total o miARNs.

El ARN total (250 ng en 20 µl) se retrotranscribió utilizando el kit: *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU). La RT-PCR del ADNc se realizó con *Power SYBR Green Master Mix* (Applied

3. Materiales y métodos

Biosystems), en un equipo de Life Technologies (*7900HT Fast-Real Time PCR System*), utilizando los cebadores descritos en la Tabla I. Estos cebadores se obtuvieron a través de Invitrogen. Los parámetros del termociclador fueron 10 minutos a 95°C; 40 ciclos de 15 segundos a 95°C; y 1 minuto a 60°C; seguidos de una curva de disociación consistente en 15 segundos a 95°C; 15 segundos a 60°C; y 15 segundos a 95°C. Cada muestra se analizó por triplicado, y se normalizó frente al ARNm de 36b4. Su valor se expresó como factor de inducción (“*fold induction*”, FI) frente al valor de la muestra control, con cálculos basados en la $\Delta\Delta Ct$.

Para los miARNs maduros, el ARN (155 ng en 10 μ l) se poliadeniló y se retrotranscribió a ADNc utilizando un Kit: *Universal cDNA Synthesis Kit II* (parte de *miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR*, Exiqon). La RT-PCR del ADNc se realizó con *ExiLENT SYBR[®] Green master mix* (Exiqon), en un equipo de Life Technologies (*7900HT Fast-Real Time PCR System*), utilizando los cebadores de Exiqon descritos en la Tabla II (*microRNA LNATM PCR primers set*). Los parámetros del termociclador fueron 10 minutos a 95°C; 40 ciclos de 10 segundos a 95°C; y 1 minuto a 60°C; seguidos de una curva de disociación consistente en 15 segundos a 95°C; 15 segundos a 60°C; y 15 segundos a 95°C. Cada muestra se analizó por triplicado y se normalizó frente a la media de la expresión del ARN de hsa-miR-191-5p, hsa-miR-103a-3p y RNU5G (*LNATM PCR primers set*, Exiqon). Su valor se expresó como FI frente al valor de la muestra control, utilizando cálculos basados en la $\Delta\Delta Ct$. En todos los casos se analizó la curva de *melting* para confirmar la especificidad de los productos de la PCR.

Tabla I: Lista de cebadores utilizados para análisis por RT-PCR.

Gen	Orientación	Secuencia del primer 5' ->3'
<i>m-Bcl2-l1</i>	Forward	AGGCGATGAGTTTGAAGCTGC
	Reverse	TGAAGCTGGGATGTTAGATCACT
<i>m-Erk1</i> (<i>MAPK3</i>)	Forward	ACCACATTCTAGGTATCTTGGGT
	Reverse	AGTTTCGGGCCTTCATGTTAAT
<i>m-Atf2</i>	Forward	CCGTTGCTATTCCTGCATCAA
	Reverse	TTGCTTCTGACTGGACTGGTT
<i>m-p38</i> (<i>MAPK14</i>)	Forward	GACCTTCTCATAGATGAGTGGAAGA
	Reverse	CAGGACTCCATTTCTTCTTGGT
<i>m-Fn1</i>	Forward	GCTCAGCAAATCGTGCAGC
	Reverse	CTAGGTAGGTCCGTTCCCACT

<i>m-Bmp2</i>	Forward Reverse	GGGACCCGCTGTCTTCTAGT TCAACTCAAATTCGCTGAGGAC
<i>m-Apaf1</i>	Forward Reverse	AGTAATGGGTCCTAAGCATGTTG GCGATTGGGAAAATCACGTAAAA
<i>m-Tradd</i>	Forward Reverse	AGCCATACAGGTAGCTTCTGC GTGGCCGGTTCACTACGAG
<i>m-Cav1</i>	Forward Reverse	AGCCCAACAACAAGGCCAT GCAATCACATCTTCAAAGTCAATCTT
<i>m-Cdh1</i>	Forward Reverse	TCGGAAGACTCCCGATTCAAA CGGACGAGGAAACTGGTCTC
<i>m-α-sma</i>	Forward Reverse	CCCAGACATCAGGGAGTAATGG TCTATCGGATACTTCAGCGTCA
<i>m-Coll1a1</i>	Forward Reverse	AATGGCACGGCTGTGTGCGA AGCACTCGCCCTCCCGTCTT
<i>m-Sod1</i>	Forward Reverse	TGTGTCCATTGAAGATCGTG CTTTGCCCAAGTCATCTTGT
<i>m-Sod2</i>	Forward Reverse	TCAGTGCTCACTCGTGTCAT ACACGATAGGTTTGGGCATA
<i>m-Cat</i>	Forward Reverse	GAACGAGGAGGAGAGGAAAC TGAAATTCTTGACCGCTTTC
<i>m-Gsr</i>	Forward Reverse	ATTGGCTGTGATGAGATGCT GGTAGGATGAATGGCAACTG
<i>m-Desmina</i>	Forward Reverse	GTTTCAGACTTGACTCAGGCAG TCTCGCAGGTGTAGGACTGG
<i>m-IL-1β</i>	Forward Reverse	AGAAGCTGTGGCAGCTACCTG GGAAAAGAAGGTGCTCATGTCC
<i>m-IL-6</i>	Forward Reverse	GAGGATACCACTCCCAACAGACC AAGTGCATCATCGTTGTTCATA
<i>m-TNF-α</i>	Forward Reverse	CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
<i>m-Hgf</i>	Forward Reverse	AAAGGGACGGTATCCATCACT GCGATAGCTCGAAGGCAAAAAG
<i>m-Pdgfr-A</i>	Forward Reverse	TCCATGCTAGACTCAGAAGTCA TCCCGGTGGACACAATTTTTC
<i>m-Pdgf-A</i>	Forward Reverse	TGGCTCGAAGTCAGATCCACA TTCTCGGGCACATGGTTAATG
<i>m-Pdgfr-B</i>	Forward Reverse	TTCCAGGAGTGATACCAGCTT AGGGGGCGTGATGACTAGG

3. Materiales y métodos

<i>m-Pdgf-B</i>	Forward Reverse	CATCCGCTCCTTTGATGATCTT GTGCTCGGGTCATGTTCAAGT
<i>h-COX-2</i>	Forward Reverse	CGCAGTACAGAAAGTATCACAGGC GCGTTTGCGGTACTCATTAAAA
<i>m-36b4</i>	Forward Reverse	AGATGCAGCAGATCCGCAT GTTCTTGCCCATCAGCACC
<i>h-36b4</i>	Forward Reverse	CCAGGTCGCCCTGTCTTCCCT CAGGCGTCCTCGTGGAAGTGAC

Tabla II: Lista de cebadores utilizados para análisis de miARNs por RT-PCR (LNATM PCR primers set; Exiqon).

Gen	Referencia
<i>hsa-miR-23a-5p</i>	205631
<i>hsa-miR-28-5p</i>	204322
<i>hsa-miR-199a-3p</i>	204536
<i>hsa-miR-29a-3p</i>	204698
<i>hsa-miR-191-5p</i>	204306
<i>hsa-miR-103a-3p</i>	204063
<i>RNU5G</i>	203908

3.19. Construcción y transfección de los vectores de miARN.

Los precursores para mmu-miR-23a y mmu-miR-28a se generaron en un vector específico para clonar miARNs (*green fluorescent protein* (proteína fluorescente verde, GFP)-*puromycin* (pEGP)-*miR cloning vector*; Cell Biolabs, San Diego, CA, EEUU). Las secuencias de la horquilla de estos miARNs se identificaron utilizando la base de datos “*Sanger Center miRNA*” (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences>) y se amplificaron por PCR, a partir de ADN genómico de células murinas. Las secuencias de los cebadores para la clonación de los precursores de miARNs se encuentran en la Tabla III. Los productos de la PCR se clonaron entre las dianas de restricción BamHI-NheI del vector pEGP-miR, y se confirmó su correcta orientación e integración mediante secuenciación.

Para los experimentos de transfección, las HSC primarias se sembraron en placas de 6 (16×10^4 células/pocillo) o 12 (6×10^4 células/pocillo) pocillos al 70% de confluencia.

Tras 24 horas, se les retiró el FBS durante 4 horas, y se transfectaron con 4 μg (placas de 6 pocillos) o 1.6 μg (placas de 12 pocillos) de pEGP-miR, utilizando Lipofectamina 2000, en DMEM sin FBS suplementado con 0.2% BSA. Tras 16 horas de incubación a 37°C, el medio de la transfección se cambió por 2 ml (placas de 6 pocillos) o 1.5 ml (placas de 12 pocillos) de medio DMEM completo sin FBS. Las células se recogieron 48 horas después de la transfección para realizar análisis de WB y RT-PCR.

Para determinar la eficiencia de la transfección, se observó la fluorescencia del GFP en las células al microscopio (DMIL-FLUO, Axiovert). La tasa de transfección se determinó con el programa *ImageJ*, y se expresó en %.

Tabla III: Lista de cebadores utilizados para la clonación de precursores de miARNs.

miARN	Orientación	Secuencia del primer 5'→3'
(mmu) pre-miR- 23a	Forward	TCGAGGATCCTATGTGAGACCCAGCCTGGT
	Reverse	TCGAGCTAGCTGCTGTGGACCTTGCTCACAA
(mmu) pre-miR- 28a	Forward	TCGAGGATCCAAAGCTTGGGAAGATAAGCTGTTGA
	Reverse	TCGAGCTAGCAACTGTGTTAACCTGTCTCTTCCTT

3.20. Análisis por WB.

Los extractos del tejido hepático (50-100 mg) o de las células ($2-3 \times 10^6$) se obtuvieron de la siguiente forma. Para el extracto total de proteínas, se aisló el sobrenadante centrifugando a 12000 rpm, 15 minutos a 4°C, con un buffer compuesto por 0.5% Chaps HCl, 10 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA y 10% glicerol. Los extractos citosólicos y nucleares se aislaron a partir de 100 mg de tejido, con una solución de sacarosa 0.3 M. Este homogeneizado se centrifugó a 3000 rpm, 10 minutos a 4°C para separar la fracción citosólica (sobrenadante) y la fracción nuclear (pellet). El sobrenadante se centrifugó 3 veces a 13000 rpm, 20 minutos a 4°C, y se pasó a un nuevo tubo. El pellet se lavó 4 veces con solución de sacarosa 0.3 M, y se centrifugó a 3000 rpm, 10 minutos a 4°C. Después, el pellet se resuspendió en RIPA y se mantuvo 1 hora en agitación a 4°C. El extracto nuclear se obtuvo centrifugando a 8500 rpm, 15 minutos a 4°C. Finalmente, los niveles de proteína se midieron utilizando el reactivo Bradford (Bio-Rad) (11).

Para los análisis por WB, estos extractos se hirvieron 5 minutos con buffer de *Laemmli*. Las proteínas (20-40 μg) se separaron con geles de electroforesis al 8-15%

3. Materiales y métodos

SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). La cantidad relativa de cada proteína se determinó con los anticuerpos policlonales o monoclonales descritos en la Tabla IV. Tras la incubación con los correspondientes anticuerpos secundarios (*anti-rabbit, anti-goat o anti-mouse horseradish peroxidase conjugated secondary antibody*; Santa Cruz), las membranas se revelaron con el protocolo ECL (quimioluminiscencia) (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, EEUU). Las densidades de las bandas se normalizaron frente a GAPDH. Las membranas se revelaron con películas (*Medical X-Ray Film Blue*; Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgium) o con un analizador de imagen luminiscente (LAS 500, GE). Se utilizaron diferentes tiempos de exposición para cada membrana, para asegurar la linealidad de la intensidad de las bandas. El análisis densitométrico se realizó con el programa *ImageJ*, y se expresó en unidades arbitrarias.

Tabla IV: *Lista de anticuerpos primarios utilizados para análisis por WB, Inmunofluorescencia o Inmunohistoquímica fluorescente.*

Detecta	Casa Comercial	Referencia
α -SMA	Sigma-Aldrich	A5228
COL1A1	Calbiochem	234167
GAPDH	Ambion	AM4300
pSMAD2/3	Santa Cruz Biotechnology	sc11769
SMAD2/3	Santa Cruz Biotechnology	sc6033
PCNA	Santa Cruz Biotechnology	sc56
Ki67	Abcam	ab15580
Caspasa 3 clibada	Cell Signaling	9661
BAX	Cell Signaling	2772
p-ERK	Cell Signaling	4370
ERK	Cell Signaling	9102
Bcl-xL	Cell Signaling	2762
BMP2	Abcam	ab6285
E-Cadherina	BD Biosciences	610181
Mcl-1	Santa Cruz Biotechnology	sc-819
COX-2	Cayman Chemical	160107
COX-2	Cayman Chemical	160112
Vimentina	Abcam	ab8978

Desmina	Abcam	ab8592
p-AKT	Cell Signaling	13038
AKT	Cell Signaling	9272
p-p38	Cell Signaling	9211
p38	Cell Signaling	9212
p-IKB α	Cell Signaling	2859
IKB α	Santa Cruz Biotechnology	sc-4094
NF- κ B (p65)	Cell Signaling	8242
Lamina B	Santa Cruz Biotechnology	sc-6217

3.21. Análisis de datos.

Los datos se expresan como la media \pm error estándar (E.E.) de al menos tres experimentos independientes. La significancia estadística se estimó utilizando el test de la *t de Student* (2 colas), para evaluar las diferencias entre las células o ratones tratados o no, dentro de un solo genotipo y entre genotipos. El análisis se realizó con los programas Excel y GraphPad Prism 5. Se consideró una $P < 0.05$ como estadísticamente significativa.

4. Resultados

4.1. Análisis de la contribución de PGE₂ dependiente de COX-2 al desarrollo de la EHNA y fibrosis hepática en modelos murinos. Vías de señalización y mecanismos moleculares implicados.

El primer objetivo consistió en analizar el papel de COX-2 en la progresión de la patogénesis de la EHNA y la fibrosis hepática. Para llevarlo a cabo, se ha utilizado un modelo de ratón transgénico con un fondo genético C57BL6JxDBA, portador del gen COX-2 de origen humano en el hepatocito, bajo el control del promotor de ApoE humano y su región HCR. A estos animales se les trató con una dieta MCD durante 2 o 4 sem. (modelo para inducir EHNA) o con una dosis i.p. de 1.6 ml/kg de CCl₄ dos veces por sem. durante 9 sem. (modelo para inducir fibrosis hepática). Al finalizar los diferentes tratamientos, se extrajeron los hígados o se aislaron los diferentes tipos celulares hepáticos de estos animales para su posterior análisis, determinando las diferencias existentes entre los ratones Wt y hCOX-2-Tg. Como resultado, se ha observado que PGE₂ dependiente de COX-2 presenta un papel protector frente al desarrollo de la EHNA y la fibrosis hepática en modelos murinos.

A continuación, se muestran más detalladamente los resultados obtenidos en este primer objetivo del trabajo.

4.1.1. La expresión constitutiva de COX-2 en el hepatocito protege a los ratones frente a la esteatohepatitis inducida por una dieta MCD.

La mayoría de los modelos murinos de esteatohepatitis no pueden simular todas las características de la EHNA en humanos. En este trabajo, se ha utilizado un modelo de dieta MCD capaz de reproducir las principales características histológicas de la esteatohepatitis observadas en la EHNA en humanos, con una rápida aparición de esteatosis, inflamación, estrés oxidativo y apoptosis, que conducen al daño hepático (69). Sin embargo, el perfil metabólico de los animales tratados con esta dieta no se correlaciona con el observado en humanos con EHNA, ya que carece de algunas de las características típicas que presentan en esta enfermedad, como la obesidad y la RI (Tabla V).

Tabla V. Características bioquímicas y metabólicas de los ratones hCOX-2-Tg tras una dieta MCD.

	RCD		MCD 2sem.		MCD 4sem.	
	Wt	hCOX-2-Tg	Wt	hCOX-2-Tg	Wt	hCOX-2-Tg
Hígado/P.C.	0.036±0.001	0.038±0.002	0.035±0.004	0.035±0.001	0.039±0.002	0.040±0.001
Glucosa en sangre (mg/dL)	183.0±1.4	174.5±3.5	116.8±4.3*	110.5±13.2*	123.8±8.5*	111.2±2.5*
TGs (mg/dL)	22.8±0.6	23.0±6.9	18.16±2.6*	18.41±0.48*	14.32±1.80*	11.25±1.21*
Colesterol (mg/dL)	94.1±4.7	90.7±4.7	80.5±3.0*	75.6±2.4*	67.1±3.1*	71.1±2.2*
HDL (%)	100.0±10.8	92.7±11.4	70.8±10.1*	69.1±2.4*	38.8±15.7*	34.8±5.1*

Tabla V. Datos de la proporción del hígado/peso corporal (P.C.) y los niveles plasmáticos de glucosa, TGs, colesterol y HDL de los ratones Wt y hCOX-2-Tg, tratados con una dieta normal RCD o MCD durante 2 y 4 sem. Los datos se representan como la media \pm E.E. (n=4-6 ratones por grupo). * $P < 0.05$ vs. Wt RCD o hCOX-2-Tg RCD.

En primer lugar, después de tratar a los animales con una dieta RCD o MCD, se analizó la expresión de COX-2 humana (hCOX-2) en extractos de hígado de los ratones Wt y hCOX-2-Tg (Figura 7A). Los niveles de la proteína hCOX-2 solo se detectaron en los ratones hCOX-2-Tg, en niveles comparables a los fisiológicos observados durante la regeneración hepática tras realizar una hepatectomía parcial (19, 107). También se midieron los niveles intrahepáticos de PGE₂, uno de los metabolitos principales derivados de la activación de COX-2 (Figura 7B). Al igual que en COX-2, los niveles de PGE₂ detectados fueron mucho más elevados (en torno a 3 veces más) en los ratones hCOX-2-Tg. Con esto se puede confirmar que hCOX-2 se expresa constitutivamente en el hígado de los ratones hCOX-2-Tg. Por otro lado, se puede apreciar que en los animales Wt tratados con la dieta MCD existe una clara tendencia a aumentar los niveles hepáticos de PGE₂.

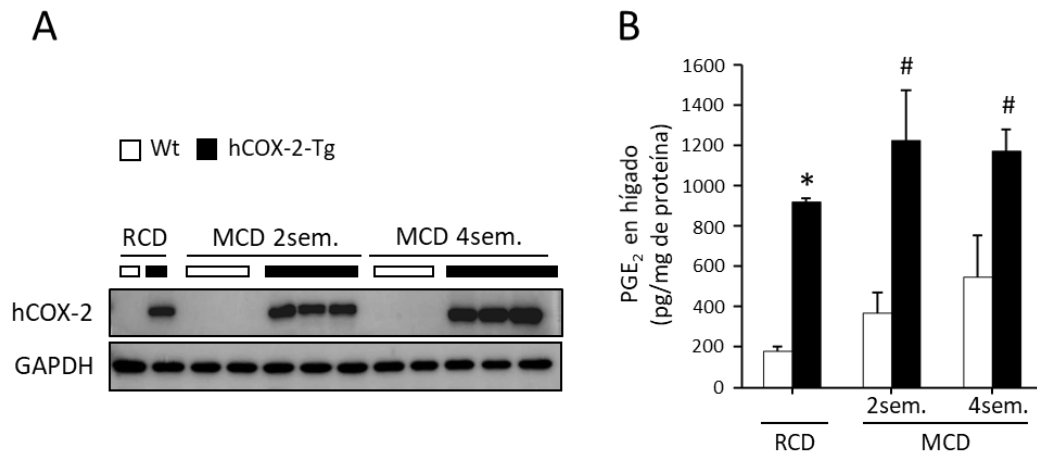


Figura 7. *hCOX-2 se expresa constitutivamente en el hígado de los ratones hCOX-2-Tg.* Se trató a los ratones Wt y hCOX-2-Tg con una dieta RCD o MCD durante 2 y 4 sem. **(A)** WB representativo de los niveles de hCOX-2 en extracto total del hígado de estos ratones. Se ha utilizado GAPDH como control de carga. **(B)** Medida de los niveles de PGE₂ en extractos de hígado de estos ratones. Los datos se representan como la media \pm E.E. (n=5-6 ratones por grupo). * $P < 0.05$ vs. Wt RCD; # $P < 0.05$ vs. Wt MCD.

Al analizar la evolución del peso corporal de estos animales, se observó que tan solo con 2 semanas de administración de la dieta MCD, tanto los ratones Wt como los hCOX-2-Tg presentaban una pérdida de más del 30% de su peso. Las diferencias de peso entre los grupos RCD y MCD en los dos genotipos no pueden atribuirse a la cantidad de comida ingerida. A pesar de no observar diferencias significativas durante las dos primeras semanas, a las cuatro semanas de tratamiento la pérdida de peso resultó ser significativamente menor en los ratones hCOX-2-Tg respecto a los Wt (Figura 8A). Al evaluar el daño hepático, se observó que la administración de la dieta MCD provocó un aumento de los niveles plasmáticos de la actividad de ALT, siendo éstos significativamente menores en los ratones hCOX-2-Tg (Figura 8B).

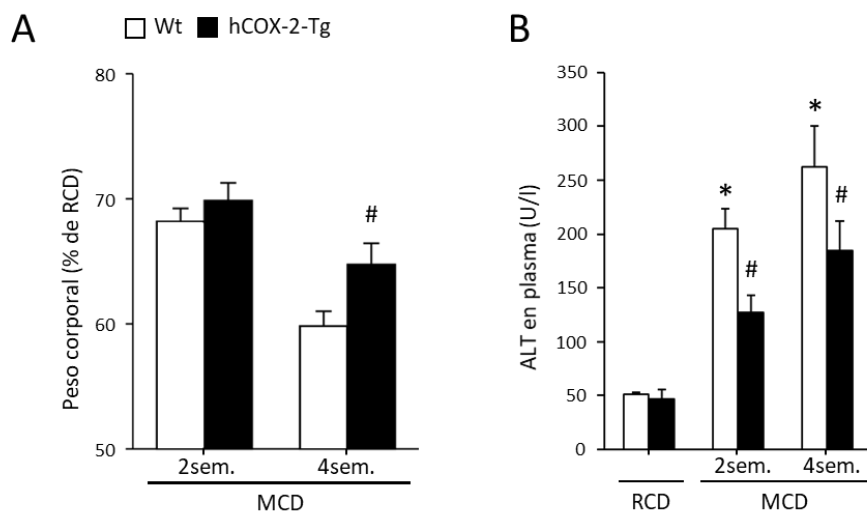


Figura 8. Los ratones *hCOX-2-Tg* se encuentran protegidos frente al daño hepático inducido por una dieta MCD. Se trató a los ratones Wt y *hCOX-2-Tg* con una dieta RCD o MCD durante 2 y 4 sem. (A) P.C. de estos animales representado en porcentaje (el P.C. basal es el 100%). (B) Niveles plasmáticos de actividad de ALT en los ratones Wt y *hCOX-2-Tg* tras la dieta MCD. Valores expresados en unidades internacionales por litro (U/l). Los datos se representan como la media \pm E.E. (n=5-6 ratones por grupo). * $P < 0.05$ vs. Wt RCD; # $P < 0.05$ vs. Wt MCD.

Para comprobar si existe una correlación entre estos niveles de ALT y el daño histológico, se realizaron tinciones de varias secciones del hígado con H&E y MTC (Figura 9A). Estas tinciones fueron evaluadas por un patólogo experimentado. Los resultados indicaron que con la dieta MCD se induce un aumento en el grado de esteatosis (que se puede observar claramente como una acumulación hepática de lípidos en la Figura 9A), inflamación y “ballooning” tanto en los ratones Wt como en los *hCOX-2-Tg*, siendo en estos últimos significativamente menor a las 4 sem. de tratamiento (Figura 9B, C, D). En consecuencia, el índice de actividad EHGNA, también resultó ser significativamente menor (Figura 9E). Este valor se calcula en base al conjunto de los grados de esteatosis, inflamación lobular y “ballooning” que presentan los animales, según el sistema de evaluación histológica para modelos animales validado por Liang *et al.* (93). Sin embargo, la tinción de las fibras de colágeno con MTC fue negativa. Es muy probable que esto se deba a que un tratamiento de 4 sem. no es suficiente para que los animales desarrollen fibrosis, ya que en otros trabajos se ha observado que la dieta MCD produce fibrosis tras 8-10 sem. de ingestión (69).

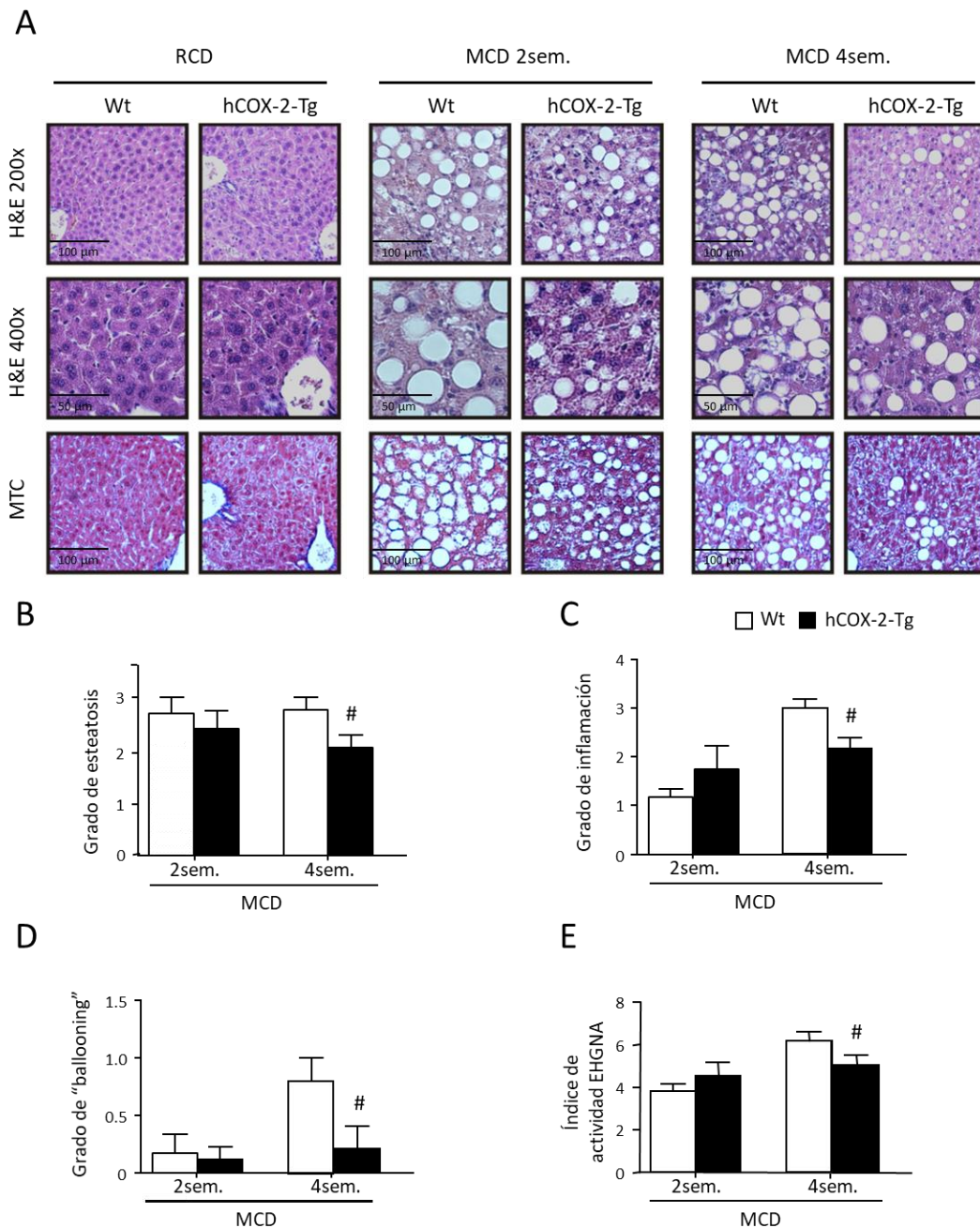


Figura 9. Los ratones *hCOX-2-Tg* se encuentran protegidos frente a la esteatosis, inflamación y “ballooning” causados por una dieta MCD. (A) Imágenes representativas de tinciones con H&E y MTC realizadas en varias secciones de los hígados de ratones Wt y *hCOX-2-Tg*, tratados con una dieta RCD o MCD durante 2 y 4 sem. (B) Cuantificación del grado de esteatosis, (C) inflamación, (D) “ballooning” e (E) índice de actividad EHGNA. Los datos se representan como la media \pm E.E. (n=5-6 ratones por grupo). # $P < 0.05$ vs. Wt MCD 4 sem.

De forma adicional, tras someter a los ratones a una dieta MCD durante 4 sem., se les proporcionó una dieta RCD durante 5 días más. Como resultado se apreció una

4. Resultados

recuperación en todos los aspectos (P.C., niveles ALT e índice de actividad EHGNA), tanto en los ratones Wt como en los hCOX-2-Tg. Esta recuperación fue mucho más evidente en los animales hCOX-2-Tg, reflejada en un mayor aumento en el P.C. y en menores niveles tanto de ALT, como del índice de actividad EHGNA, comparado con los ratones Wt (Figura 10A, B, C, D). Todo esto indica que la expresión de COX-2 en el hepatocito no solo protege frente al daño hepático y la esteatosis producidos por una dieta MCD, sino que, además, acelera la recuperación tras la misma.

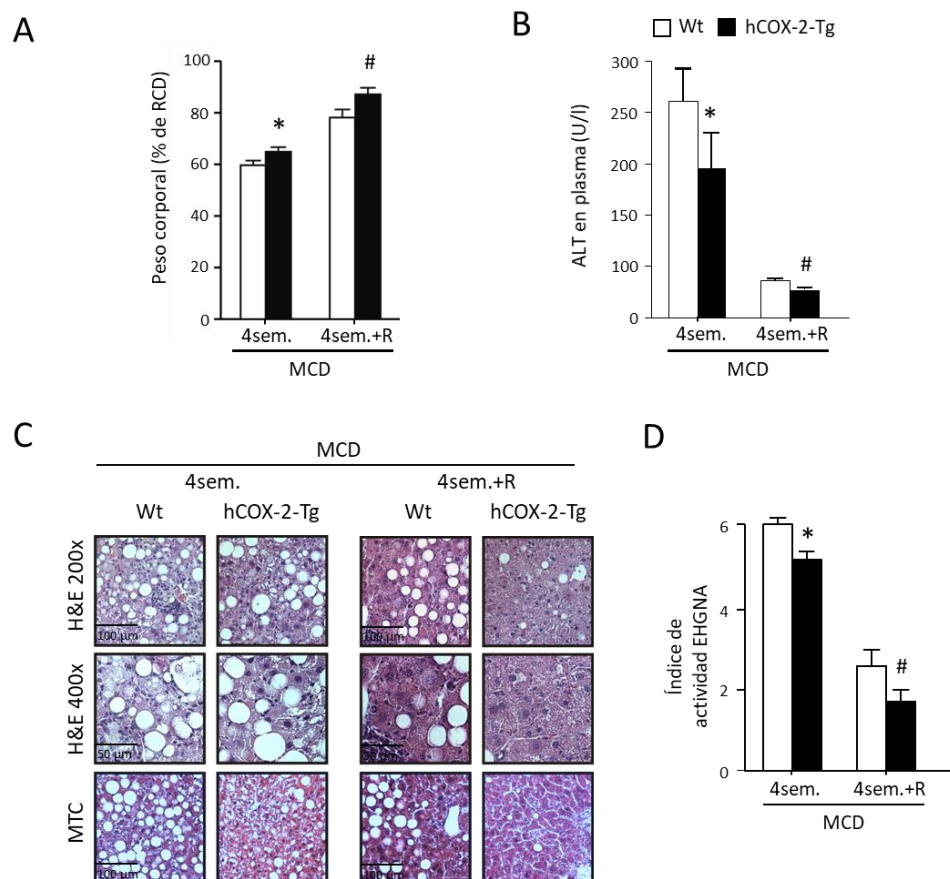


Figura 10. Los ratones hCOX-2-Tg tratados con MCD se recuperan mejor que los Wt tras ingerir de nuevo una dieta RCD. En el modelo R, se trató a los animales Wt y hCOX-2-Tg con una dieta MCD durante 4 sem., tras lo cual, se les trató con una dieta RCD durante 5 días. (A) P.C. de los ratones Wt y hCOX-2-Tg representado en porcentaje (el P.C. basal es el 100%). (B) Niveles plasmáticos de actividad de ALT en los ratones Wt y hCOX-2-Tg. Valores expresados en unidades internacionales por litro (U/l). (C) Imágenes representativas de tinciones con H&E y MTC realizadas en varias secciones del hígado de ratones Wt y hCOX-2-Tg. (D) Cuantificación del índice de actividad EHGNA. Los datos se representan como la media \pm E.E. (n=6 ratones por grupo). * $P < 0.05$ vs. Wt MCD; # $P < 0.05$ vs. Wt MCD+R.

Está demostrado que en el modelo de dieta MCD, la aparición de la esteatosis hepática y el aumento de los niveles plasmáticos de ALT van seguidos de un aumento de la inflamación (106). En la Figura 9C se puede ver el incremento de la inflamación tras

la dieta MCD, siendo este menor en los ratones hCOX-2-Tg tras 4 sem. de tratamiento. Debido a esto se analizó el perfil inflamatorio en mayor profundidad. Para ello, se midieron los niveles plasmáticos de IL-1 β , IL-6, TNF- α (citoquinas pro-inflamatorias) y MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos-1, principal ligando que media la infiltración y reclutamiento de macrófagos en el hígado, junto a su receptor CCR2 (receptor de quimioquina C-C 2)) (Figura 11A) en los animales sometidos a una dieta MCD durante 2 y 4 sem. Se observó que los niveles de estas citoquinas aumentan, sobre todo a las cuatro sem. Además, el incremento en los ratones Wt es significativamente mayor frente al observado en los ratones hCOX-2-Tg. MCP-1 tiene un papel importante en el reclutamiento de macrófagos. Para analizar con más detalle el reclutamiento e infiltración de estas células en el proceso de inflamación, se aislaron las NPCs de los ratones alimentados con una dieta MCD durante cuatro sem. para su análisis por citometría de flujo. En primer lugar, se analizaron los niveles de células CD45⁺ (marcador de leucocitos). Tras la dieta MCD, los niveles de células marcadas con CD45⁺ fueron 5 veces mayores en el hígado de los ratones Wt y 3 veces en los hCOX-2-Tg, al compararlos con los animales alimentados con una dieta RCD (Figura 11B). Dentro de esta fracción, se analizó el número existente de células F4/80⁺ CD11b⁺ (marcador de macrófagos, células responsables de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias). El número de células fue significativamente mayor en el hígado de los ratones Wt con MCD, respecto a los tratados con una dieta RCD. Sin embargo, en los animales hCOX-2-Tg apenas se apreció un aumento (Figura 11C). Para comprobar el nivel de infiltración de estos macrófagos en el hígado (asociado a MCP-1), se analizó la expresión del receptor CCR2 en estas células (Figura 11D). De la misma forma, tras una dieta MCD, el número de células CCR2⁺ fue significativamente mayor en los Wt al compararlos con los hCOX-2-Tg. También se analizaron los niveles de células Ly6C⁺ CCR2⁺, para determinar el número de monocitos inflamatorios circulantes (Figura 11E). El resultado permitió confirmar que el número de macrófagos infiltrados y la inflamación derivada de los mismos, es mayor en los ratones Wt que en los hCOX-2-Tg, tratados con dieta MCD. A su vez, esto se corresponde con lo observado al analizar la expresión de los genes inflamatorios IL-1 β , IL-6 y TNF- α en el hígado entero (Figura 11F) y en las células de Kupffer (Figura 11G) en los animales tratados con la dieta MCD. En conjunto, todos estos resultados indican que la expresión constitutiva de COX-2 es capaz de atenuar la infiltración de macrófagos y la respuesta inflamatoria inducida por una dieta MCD.

4. Resultados

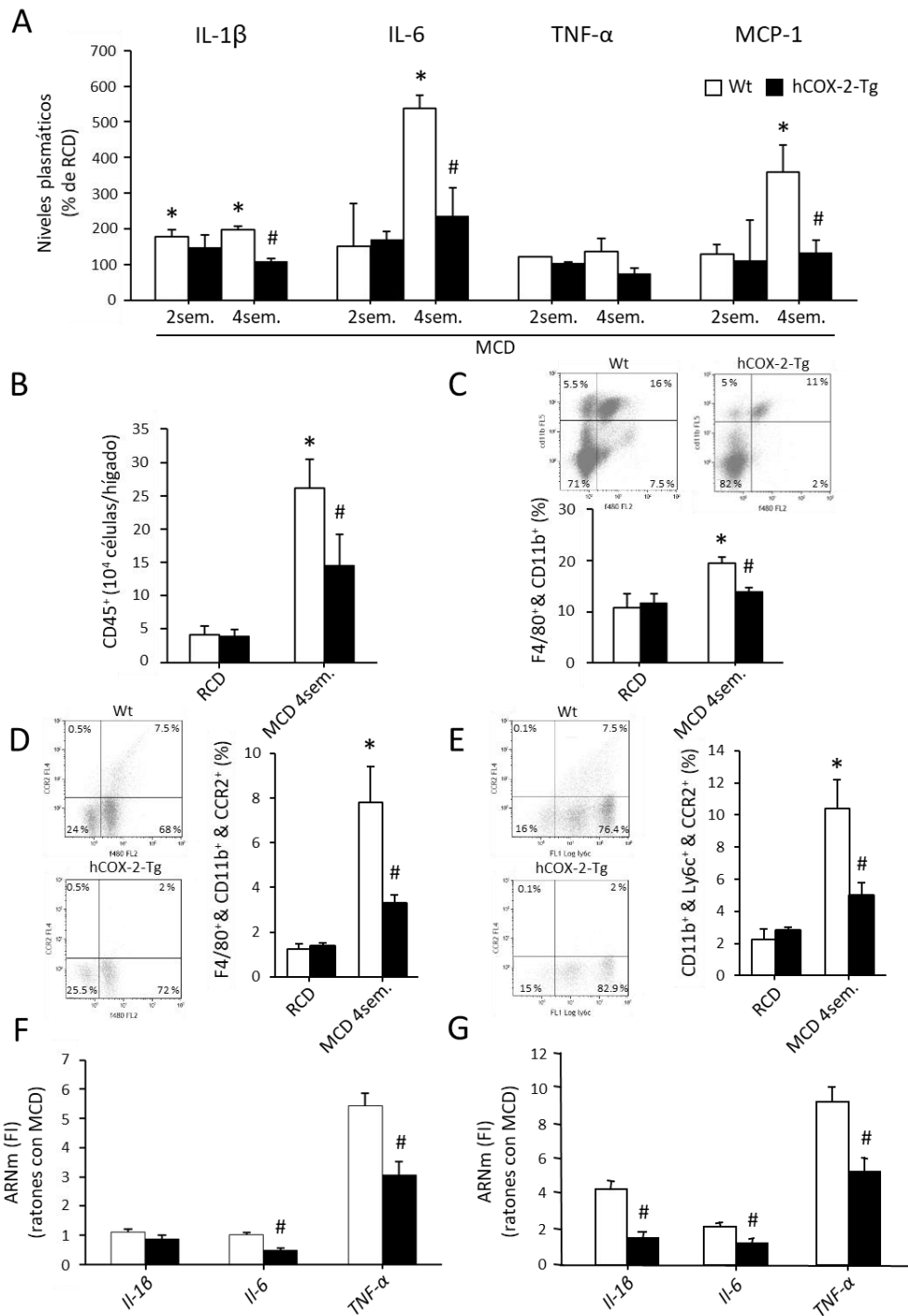


Figura 11. Análisis de citoquinas pro-inflamatorias e infiltración de macrófagos hepáticos en los ratones Wt y hCOX-2-Tg tras una dieta MCD. (A) Niveles plasmáticos de IL-1β, IL-6, TNF-α y MCP-1, representados en porcentaje (siendo Wt o Tg RCD el 100%). (B, C, D, E) Aislamiento de NPCs del hígado de ratones Wt y hCOX-2-Tg. (B) Análisis de las células CD45⁺. (C) Porcentaje de células F4/80⁺ CD11b⁺ presentes en la fracción de células CD45⁺ de (B). (D) Porcentaje de células CCR2⁺ presentes en la fracción de células F4/80⁺ CD11b⁺, y (E) CD11b⁺ Ly6C⁺. Los datos se representan como la media ± E.E. (n=5-6 ratones por grupo). * $P < 0.05$ vs. Wt RCD; # $P < 0.05$ vs. Wt MCD. Expresión del ARNm de marcadores pro-inflamatorios (IL-1β, IL-6 y TNF-α) en el hígado (F) y células de Kupffer (G), de los ratones Wt y hCOX-2-Tg tratados con una dieta MCD durante 4 sem., analizados por RT-PCR. Los valores se han normalizado

frente al ARNm de 36b4, y se han expresado como FI frente al Wt o Tg RCD. Los datos se representan como la media \pm E.E. (n=4 ratones por grupo). # $P < 0.05$ vs. Wt MCD.

Finalmente, se analizaron los niveles de apoptosis y de estrés oxidativo en los animales tratados con dieta MCD, ya que también son procesos característicos de la EHNA. En trabajos previos del grupo, se observó que el proceso de apoptosis en el hepatocito se encuentra incrementado en pacientes con EHNA (56), y que COX-2 presenta un papel protector frente a la apoptosis hepática inducida por hiperglicemia en ratones diabéticos (45). Se midieron la actividad de las caspasas-3 y 8 y los niveles de proteínas pro- y anti-apoptóticas en el hígado de los ratones alimentados con una dieta MCD, para analizar con más detalle el efecto protector de COX-2. El aumento de la actividad de las caspasas solo se aprecia en los ratones Wt tratados con la dieta durante 4 sem. (Figura 12A). Ocurrió lo mismo con el incremento en la relación Bax/Bcl-xL. Por el contrario, en el hígado de los ratones hCOX-2-Tg se observó un aumento de la proteína Mcl-1 (anti-apoptótica), reflejando que estos animales se encuentran protegidos frente a la apoptosis (Figura 12B).

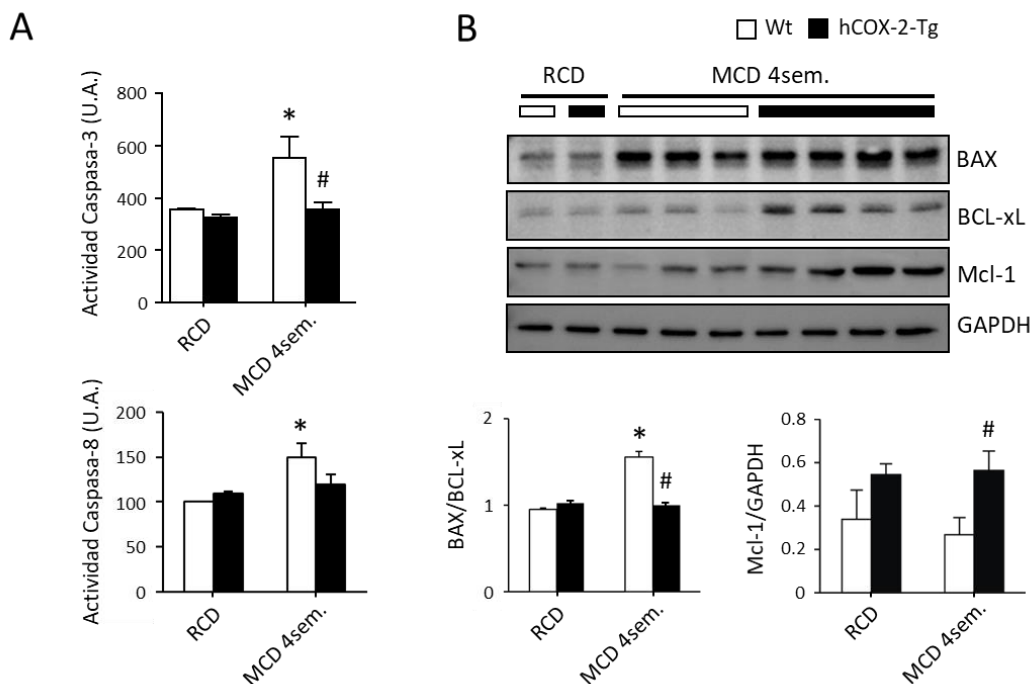


Figura 12. La expresión de COX-2 presenta un papel protector frente a la apoptosis. (A) Medida de la actividad de las caspasas-3 y 8 en el hígado de los ratones Wt y hCOX-2-Tg tratados con una dieta RCD y MCD durante 4 sem. Valores expresados en unidades arbitrarias (U.A.) (B) WB representativo que muestra los niveles de BAX, BCL-xL y Mcl-1, en el hígado de estos animales. Se ha representado la relación BAX/BCL-xL, y GAPDH se ha utilizado como control de carga. Los datos se representan como la media \pm E.E. (n=4-5 ratones por grupo). * $P < 0.05$ vs. Wt RCD; # $P < 0.05$ vs. Wt MCD.

Respecto al estrés oxidativo, se analizó el grado de LPO, basado en la reacción del TBA con MDA (producto de la peroxidación lipídica) y la relación de GSSG frente a GSht (marcador de estado redox intracelular). Se observó que con la dieta MCD, se incrementaron los niveles de LPO, siendo este aumento significativamente mayor en los ratones Wt respecto a los hCOX-2-Tg. Además, la relación GSSG/GSht solo se incrementó de forma significativa en los ratones Wt con MCD (Figura 13A). Esto indica que en los ratones Wt existe un estrés oxidativo más acentuado. Por otro lado, se conoce que los productos derivados del estrés oxidativo pueden mediar la infiltración de células inflamatorias mediante la activación de la vía de NF- κ B, además de que se ha comprobado que esta vía se encuentra activada en el modelo de esteatohepatitis inducida por una dieta MCD (87). Por tanto, se evaluó si esta vía participaba en la regulación de la inflamación en el modelo de ratón hCOX-2-Tg. Para ello, se midieron los niveles nucleares de NF- κ B y los citoplasmáticos de I κ B α fosforilada en extractos del hígado de los diferentes grupos experimentales (Figura 13B). Se observó un aumento significativo tras la dieta solo en los ratones Wt, indicando que la activación de la vía de NF- κ B tras el tratamiento con MCD se encuentra atenuada en los hCOX-2-Tg. En conjunto, estos resultados indican que la expresión de COX-2 en el hepatocito presenta un papel protector frente al estrés oxidativo y la inflamación derivada del mismo, ambos inducidos por una dieta MCD.

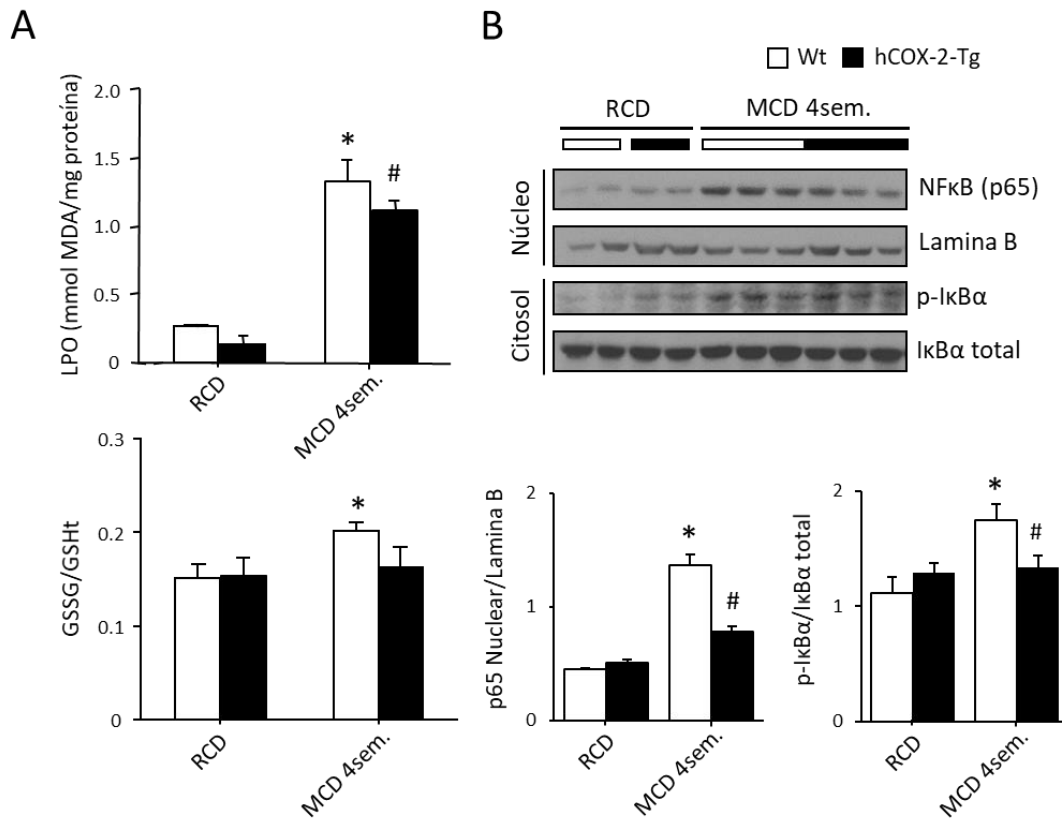


Figura 13. La expresión de COX-2 presenta un papel protector frente al estrés oxidativo. (A) Medida de los niveles de LPO, y el contenido de GSSG frente al GSHT, en el hígado de los ratones Wt y hCOX-2-Tg tratados con una dieta RCD y MCD durante 4 sem. **(B)** WB representativo que muestra los niveles de p65 nuclear y p-IK β α citosólica, en el hígado de estos animales. Se ha representado la relación de p-IK β α/IK β α total, y Lamina B se ha utilizado como control de carga en la fracción nuclear. Los datos se representan como la media \pm E.E. (n=4-5 ratones por grupo). * $P < 0.05$ vs. Wt RCD; # $P < 0.05$ vs. Wt MCD.

4.1.2. La expresión de PGE₂ dependiente de COX-2 protege a los hepatocitos aislados frente a la apoptosis y el estrés oxidativo inducidos por TGF- β 1.

Respecto a la función hepato-protectora de COX-2 frente a la apoptosis y el estrés oxidativo observado en los animales tratados con una dieta MCD, se examinó su papel específico en el hepatocito. Para ello, se aislaron hepatocitos del hígado de los ratones Wt y hCOX-2-Tg, y se trataron con PGE₂ 5 μ M, TGF- β 1 2 ng/ml y DFU 5 μ M durante 16 horas/TN. Se analizó la vía de señalización de TGF- β 1, ya que en otros trabajos se ha visto que TGF- β 1 participa en el desarrollo de la esteatohepatitis regulando la apoptosis del hepatocito a través de la activación de la vía de señalización de SMAD 2/3 (168). Los resultados obtenidos indican que TGF- β 1 induce la apoptosis en los hepatocitos aislados

4. Resultados

de los ratones Wt, mediante un aumento de la actividad de la caspasa-3 y de la relación Bax/Bcl-xL, mientras que dicho efecto se encuentra atenuado en los ratones hCOX-2-Tg (Figura 14A, B, C). Por otra parte, al co-tratar a los hepatocitos aislados de los ratones Wt con TGF- β 1 y PGE₂ se observó una disminución de la apoptosis, mientras que al tratar a los hepatocitos de los ratones hCOX-2-Tg con TGF- β 1 y DFU, la apoptosis aumentó. Para determinar la existencia de estrés oxidativo, se midieron los niveles de especies oxidantes utilizando un ensayo con la sonda DCFH. Los resultados obtenidos coinciden con los observados en lo que respecta a la apoptosis, ya que la fluorescencia derivada de DCFH se incrementó únicamente en los hepatocitos de los ratones Wt tratados con TGF- β 1. Este efecto fue revertido por el co-tratamiento con PGE₂, y además, en los hepatocitos de los ratones hCOX-2-Tg, DFU aumentó los niveles de fluorescencia en presencia de TGF- β 1, reflejando la especificidad del efecto derivado de COX-2 (Figura 14D).

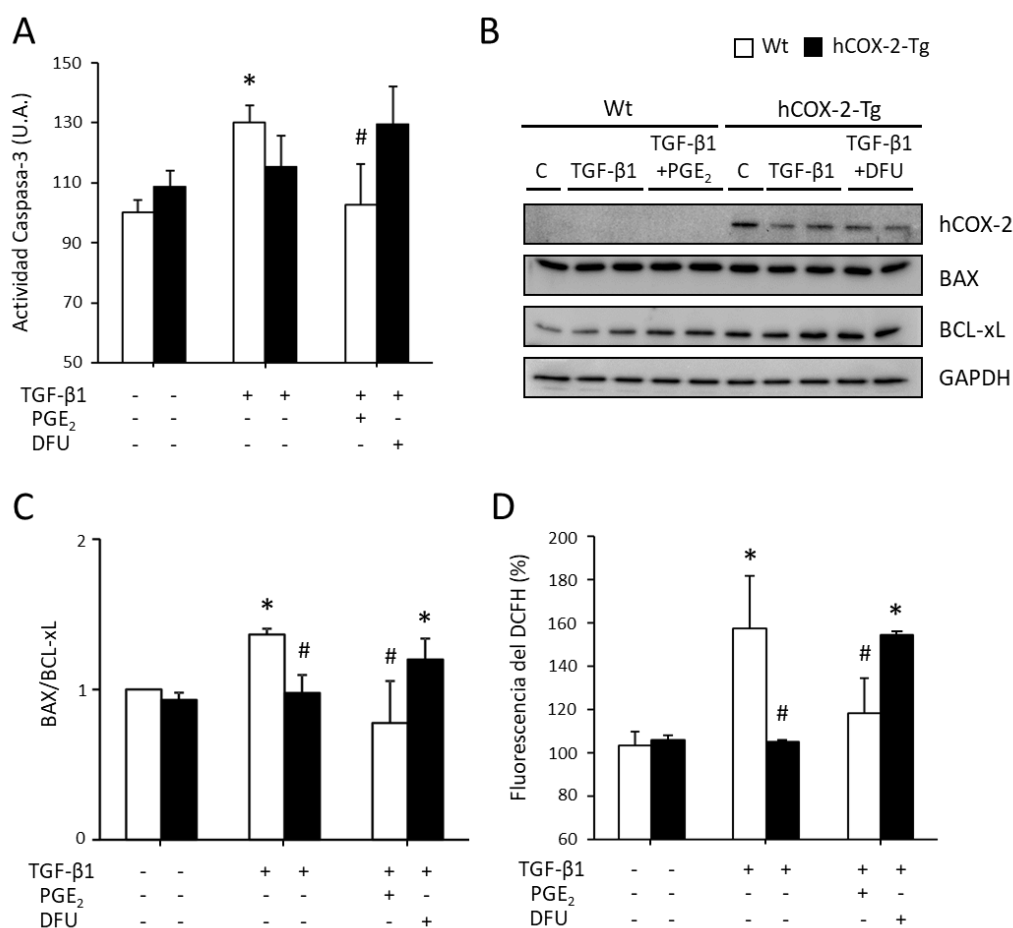


Figura 14. La expresión de PGE₂ protege a los hepatocitos aislados frente a la apoptosis y el estrés oxidativo inducidos por TGF- β 1. (A) Medida de la actividad de la caspasa-3 en los hepatocitos aislados de los ratones Wt y hCOX-2-Tg, tratados con PGE₂ 5 μ M, TGF- β 1 2 ng/ml y DFU 5 μ M 16 horas/TN. Valores expresados en U.A. (B) WB representativo que muestra los niveles de hCOX-2, BAX y BCL-xL en hepatocitos aislados de estos animales. (C) Se ha

representado la relación de BAX/BCL-xL, utilizando GAPDH como control de carga. **(D)** Estado redox estimado por la fluorescencia derivada de DCFH en hepatocitos aislados de Wt y hCOX-2-Tg. Los datos se representan como la media \pm E.E. de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ vs. Wt control; # $P < 0.05$ vs. Wt TGF- β 1.

En este mismo sentido, en la Tabla VI se indican los niveles de expresión de ARNm de varios genes que codifican para proteínas anti-oxidantes (Catalasa (*Cat*), Superóxido dismutasa (*Sod1*, *Sod2*) y Glutación reductasa (*Gsr*)). El aumento observado en los hepatocitos de los ratones hCOX-2-Tg frente a los Wt sugiere que estos genes median el efecto protector ejercido por PGE₂ frente al estrés oxidativo. Sin embargo, es interesante señalar que el tratamiento con TGF- β 1 aumenta su expresión sólo en los hepatocitos de los ratones hCOX-2-Tg. Esto indica que PGE₂ aumenta los niveles de estos genes anti-oxidantes como una respuesta protectora frente al daño inducido por TGF- β 1 en los ratones hCOX-2-Tg. El co-tratamiento con TGF- β 1 y DFU disminuyó los niveles de expresión de estos genes, apoyando la hipótesis propuesta. Todos estos resultados indican que PGE₂ derivada de la expresión constitutiva de COX-2 presenta un papel protector en la regulación de la apoptosis y del estrés oxidativo inducidos por TGF- β 1 en el hepatocito.

Tabla VI. Expresión del ARNm de genes anti-oxidantes en hepatocitos aislados procedentes de los ratones Wt y hCOX-2-Tg.

	Wt			hCOX-2-Tg		
	Control	TGF- β 1	TGF- β 1+PGE ₂	Control	TGF- β 1	TGF- β 1+DFU
<i>Cat</i>	1.00 \pm 0.07	0.39 \pm 0.01*	0.59 \pm 0.16	0.97 \pm 0.45	2.50 \pm 1.01*#	1.56 \pm 0.12#
<i>Sod1</i>	1.00 \pm 0.16	1.04 \pm 0.25	0.94 \pm 0.02	1.44 \pm 0.17	1.30 \pm 0.07	1.31 \pm 0.09
<i>Sod2</i>	1.00 \pm 0.37	1.13 \pm 0.55	0.85 \pm 0.14	2.31 \pm 0.85*	4.63 \pm 2.57*#	2.28 \pm 0.54
<i>Gsr</i>	1.00 \pm 0.09	0.58 \pm 0.04*	0.79 \pm 0.06	1.52 \pm 0.49	2.36 \pm 0.66*#	1.84 \pm 0.37#

Tabla VI. Expresión del ARNm de *Cat*, *Sod1*, *Sod2* y *Gsr*, en hepatocitos aislados de ratones Wt y hCOX-2-Tg, analizados por RT-PCR. Los valores se han normalizado frente al ARNm de 36b4, y se han expresado como FI frente al Wt control. Los datos se representan como la media \pm E.E. de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ vs. Wt control; # $P < 0.05$ vs. Wt TGF- β 1.

4.1.3. La expresión constitutiva de COX-2 en el hepatocito protege frente a la fibrosis inducida por CCl₄, mediante la inhibición de la activación de las HSC tanto *in vivo* como *in vitro*.

Tras estudiar el efecto de COX-2 en la EHNA, se analizó su papel en el desarrollo de la fibrosis hepática. Para ello se trataron a los animales Wt y hCOX-2-Tg con Oil o CCl₄ durante 9 sem. En primer lugar, y de igual forma que en el modelo de dieta MCD, se analizaron los niveles de la proteína hCOX-2 (Figura 17A) y los niveles intrahepáticos de PGE₂ (Figura 16A), confirmando de nuevo que hCOX-2 se expresa constitutivamente en el hígado de los ratones hCOX-2-Tg. Tras esto, se realizaron tinciones de varias secciones del hígado de estos animales con H&E, MTC y Rojo Sirio, que fueron evaluadas por un patólogo experimentado para determinar el grado de fibrosis. Los resultados obtenidos indican que tras el tratamiento con CCl₄, el grado de fibrosis es significativamente menor en los ratones hCOX-2-Tg respecto a los Wt (Figura 15A, B). Este efecto se correlaciona con niveles plasmáticos de actividad de ALT más bajos en los ratones hCOX-2-Tg (Figura 16B).

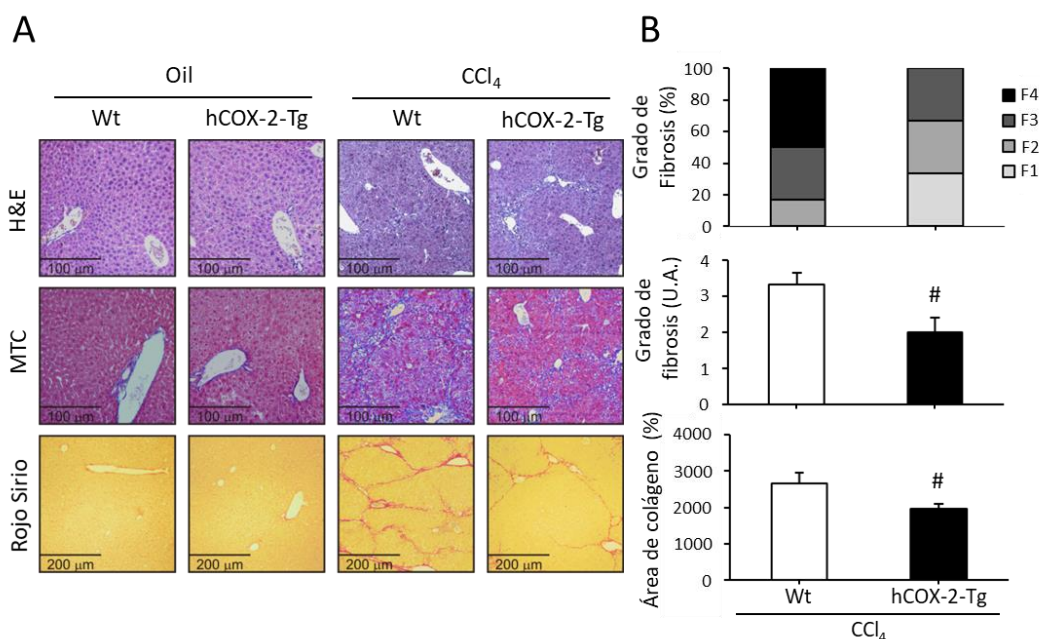


Figura 15. Los ratones hCOX-2-Tg presentan un menor grado de fibrosis hepática. (A) Imágenes representativas de tinciones con H&E, MTC y Rojo Sirio realizadas en varias secciones de los hígados de ratones Wt y hCOX-2-Tg, tratados con Oil o CCl₄ durante 9 sem. (B) Cuantificación del grado de fibrosis y el área de colágeno. Los datos se representan como la media ± E.E. (n=6-8 ratones por grupo). # *P* < 0.05 vs. Wt CCl₄.

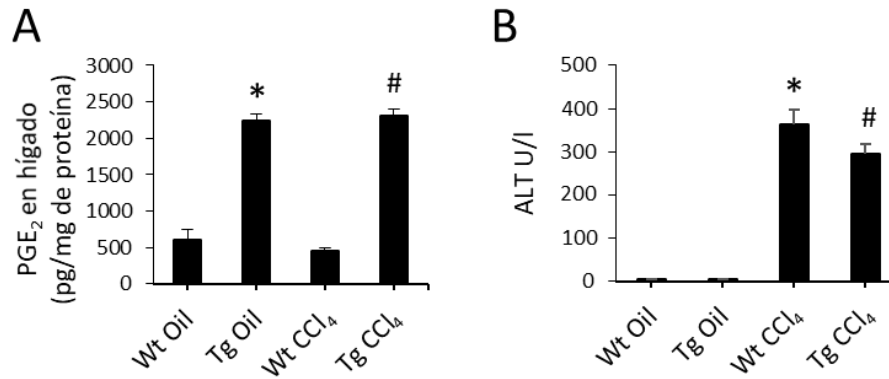


Figura 16. (A) Medida de los niveles de PGE₂ en extractos de hígado de los ratones Wt y hCOX-2-Tg tratados con CCl₄ durante 9 sem. (B) Niveles plasmáticos de actividad de ALT en estos ratones. Valores expresados en unidades internacionales por litro (U/l). Los datos se representan como la media \pm E.E. (n=3-4 (A); o 12-23 (B) ratones por grupo). * $P < 0.05$ vs. Wt Oil. # $P < 0.05$ vs. Wt CCl₄.

Tras esto, se analizaron por WB los niveles de expresión de diversos marcadores pro-fibróticos en el hígado (Figura 17A, B, C, D). Se observó un aumento significativo en los niveles de SMAD 2/3 fosforilada en los ratones Wt CCl₄ respecto a los ratones hCOX-2-Tg, lo que indica una menor activación de la señalización por TGF- β 1 en los ratones hCOX-2-Tg (Figura 17A, B). En línea con esto, tanto los niveles de COL1A1, como el contenido de hidroxiprolina hepática, fueron menores en los hígados de los ratones hCOX-2-Tg tratados con CCl₄ (Figura 17A, C). Asimismo, se observaron menores niveles de expresión del resto de marcadores pro-fibróticos analizados (desmina, α -SMA y vimentina) en los ratones hCOX-2-Tg tratados con CCl₄, frente a los ratones Wt (Figura 17A, D).

4. Resultados

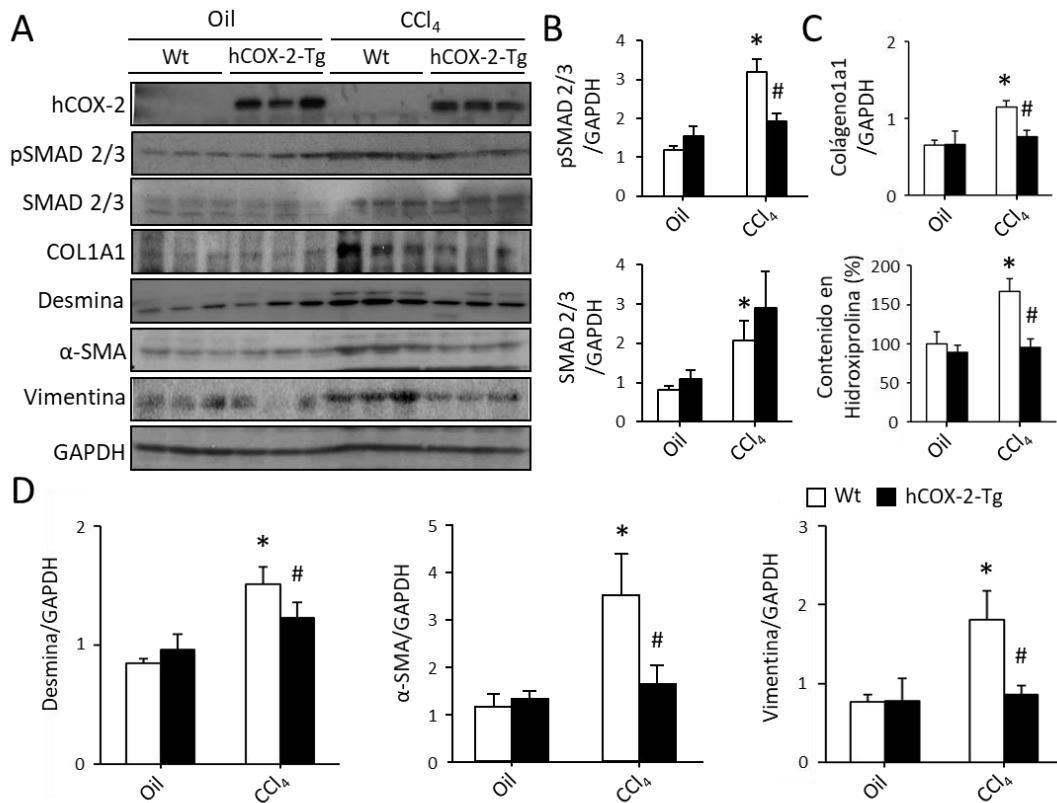


Figura 17. La expresión de COX-2 atenúa los niveles de marcadores pro-fibróticos en el hígado. (A) WB representativo que muestra los niveles de hCOX-2, pSMAD 2/3, SMAD 2/3, COL1A1, Desmina, α -SMA y Vimentina en los hígados de ratones Wt y hCOX-2-Tg, tratados con CCl₄ durante 9 sem. Para el análisis de la densitometría (B, C, D), se ha utilizado GAPDH como control de carga. El contenido en hidroxiprolina (C) se expresa en porcentaje (siendo Wt Oil el 100%). Los datos se representan como la media \pm E.E. (n=6-8 ratones por grupo). * $P < 0.05$ vs. Wt Oil; # $P < 0.05$ vs. Wt CCl₄.

La idea de un posible efecto anti-fibrótico de COX-2, se vio reforzada por los resultados obtenidos al analizar los niveles del ARNm en el hígado de los ratones Wt y hCOX-2-Tg tratados con CCl₄ (Figura 18). Los niveles de expresión de *desmina*, α -*Sma* y *Colla1* fueron significativamente menores en los ratones hCOX-2-Tg frente a los ratones Wt, tras un tratamiento con CCl₄. Ocurrió lo mismo al analizar los niveles de *Pdgf-A* y *B* (alfa o beta) y sus receptores (*Pdgfr*), factores que cumplen un papel importante en la inducción de la fibrosis hepática (8). Aunque no se observaron diferencias significativas en los niveles de *Pdgf-A*, en los hígados de los ratones hCOX-2-Tg tratados con CCl₄ los niveles de *Pdgf-B* y su receptor resultaron ser significativamente menores que en los ratones Wt. Finalmente, el análisis de *Hgf* (factor de crecimiento de los hepatocitos, conocido por presentar un papel hepato-protector) indicó que su expresión está aumentada en los ratones hCOX-2-Tg. En conjunto, todos

estos resultados indican que COX-2 atenúa la inducción de diversos marcadores pro-fibróticos, mostrando un papel protector frente a la fibrosis hepática inducida por CCl₄.

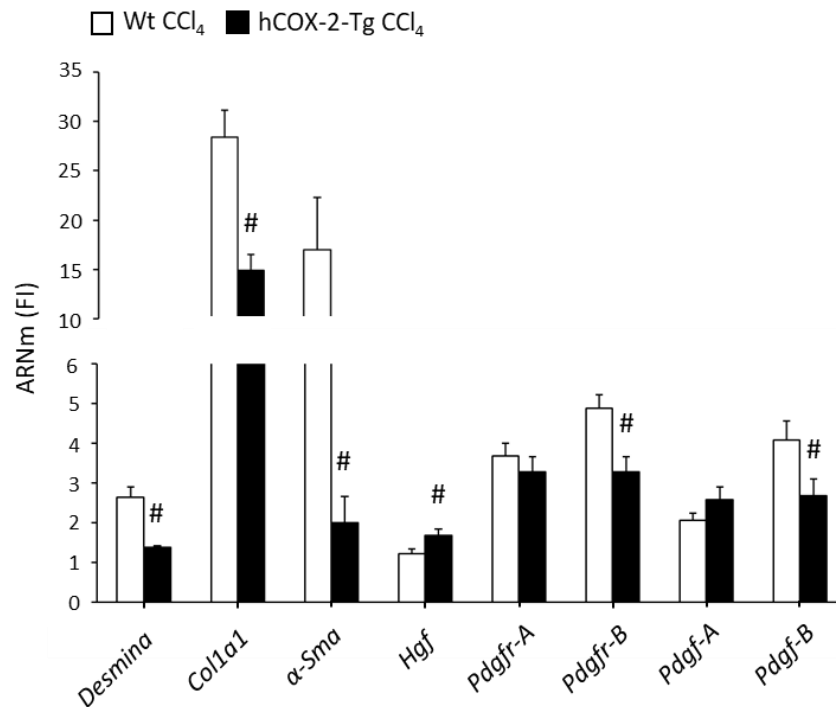


Figura 18. La expresión de COX-2 en el hepatocito atenúa los niveles de ARNm de marcadores pro-fibróticos tras un tratamiento con CCl₄. Expresión del ARNm de *Desmina*, *Col1a1*, *α-Sma*, *Hgf*, *Pdgfr-A*, *Pdgfr-B*, *Pdgf-A* y *Pdgf-B* en el hígado de los ratones Wt y hCOX-2-Tg tratados con CCl₄ durante 9 sem., analizados por RT-PCR. Los valores se han normalizado frente al ARNm de 36b4, y se han expresado como FI frente al Wt Oil (solo representados los valores de los tratados con CCl₄). Los datos se representan como la media ± E.E. (n=4-5 ratones por grupo). # $P < 0.05$ vs. Wt CCl₄.

A continuación, se analizó en mayor profundidad el mecanismo por el que COX-2 protege frente a la fibrosis hepática inducida por CCl₄. Puesto que la expresión de hCOX-2 solo se detectó en los hepatocitos aislados, y no en las HSC (Figura 19A), el estudio se centró en analizar el papel de PGE₂ dependiente de COX-2 producida por los hepatocitos en la activación de las HSC en los animales Wt y hCOX-2-Tg. En primer lugar, se midieron los niveles de expresión del ARNm de *Col1a1* y *α-Sma* en las HSC aisladas del hígado de los ratones Wt y hCOX-2-Tg. Se observó que, tras el tratamiento con CCl₄, el incremento de ambos genes es mucho mayor en los ratones Wt comparado con lo observado en los ratones hCOX-2-Tg (Figura 19B). Lo mismo se observó al analizar los niveles de α-SMA mediante WB (Figura 20). Esto indica que la expresión de COX-2 en el hepatocito previene la activación de las HSC *in vivo*.

4. Resultados

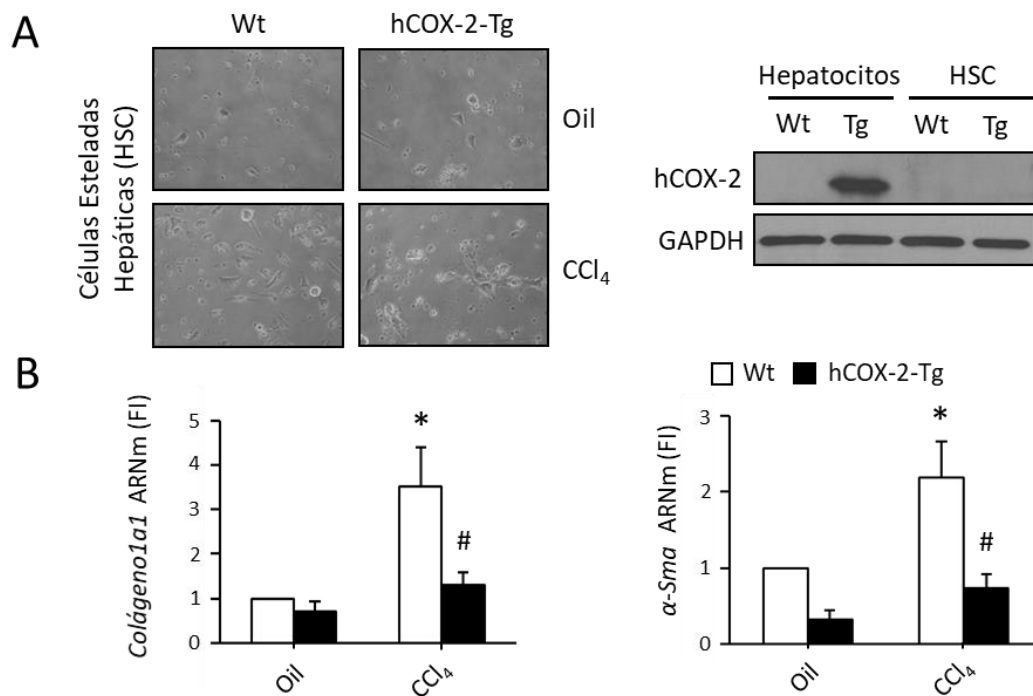


Figura 19. La expresión de COX-2 en el hepatocito previene la activación de las HSC in vivo.

(A) Microfotografía de las HSC tras 3 días en cultivo, aisladas de los ratones Wt y hCOX-2-Tg, tratados con Oil o CCl₄ durante 9 sem. (izqda.). WB representativo de los niveles de hCOX-2 en los hepatocitos y HSC aislados de estos animales. Se ha utilizado GAPDH como control de carga (dcha.). (B) Expresión del ARNm de *Colla1* y *α-Sma* en las HSC aisladas de los ratones Wt y hCOX-2-Tg tratados con CCl₄, analizados por RT-PCR. Los valores se han normalizado frente al ARNm de 36b4, y se han expresado como FI frente al Wt Oil. Los datos se representan como la media ± E.E. (n=10-12 ratones por grupo). * $P < 0.05$ vs. Wt Oil; # $P < 0.05$ vs. Wt CCl₄.

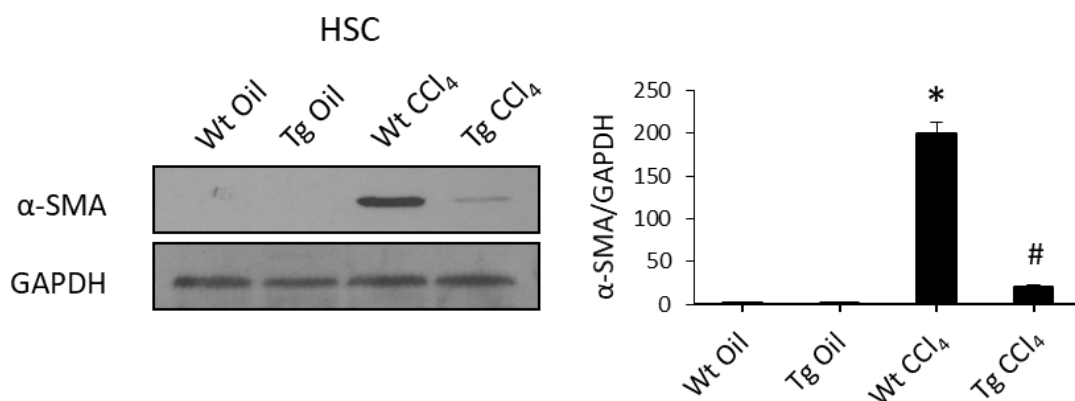


Figura 20. WB representativo de los niveles de α-SMA en las HSC aisladas de los ratones Wt y hCOX-2-Tg tratados con CCl₄ durante 9 sem. Para el análisis de la densitometría, los valores se han representado frente al valor del Wt Oil, y se ha utilizado GAPDH como control de carga. Los datos se representan como la media ± E.E. de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ vs. Wt Oil. # $P < 0.05$ vs. Wt CCl₄.

En segundo lugar, se analizó el papel de PGE₂ en la activación de las HSC *in vitro*. Para ello se utilizó una línea de células esteladas humanas (LX-2) a las que se trató con PGE₂ 5 μM TN y/o con TGF-β1 2 ng/ml durante 6 horas. Se analizaron los niveles de las proteínas de COL1A1 y α-SMA en estas células. En la Figura 21A se observa que el aumento en la expresión de COL1A1 y α-SMA debido al estímulo con TGF-β1 se revierte tras el tratamiento con PGE₂, lo que indica un efecto anti-fibrótico de la misma, previniendo que se induzca la activación de la línea celular LX-2 *in vitro*. Finalmente, se trataron las células LX-2 con PGE₂ 5 μM y diversos inhibidores farmacológicos durante 12 horas, para determinar qué vías de señalización podrían estar implicadas en el efecto que ejerce COX-2 sobre la expresión de α-SMA. Se utilizaron inhibidores de PI3K (LY294002), PKC (Gö6983), PKA (4-ciano-3-metil-isoquinolina, CMI), p38 (BRIB796), MEK (Proteína quinasa quinasa activada por mitógenos)/ERK (PD98059), NF-κB (BAY11-7085) y antagonistas de los receptores EP2 y EP4. En la Figura 21B se observa que casi todos los inhibidores utilizados revierten la disminución inducida por la PGE₂ en los niveles de α-SMA. Esto indica que el proceso de regulación es complejo, ya que implicaría la participación de múltiples vías de señalización. Por otro lado, al utilizar los antagonistas de los receptores de PGE₂ (EP2 y EP4), también se observó una reversión de los niveles de α-SMA (Figura 21C), indicando que PGE₂ podría ejercer su función anti-fibrótica a través de dichos receptores.

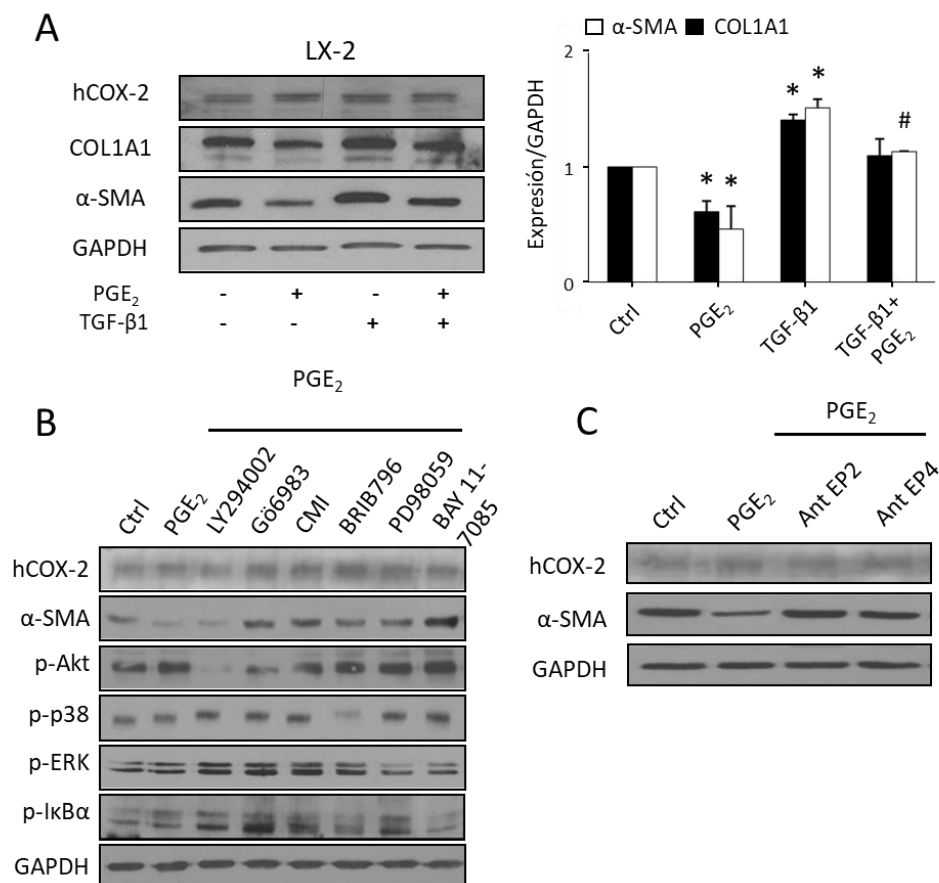


Figura 21. Papel de PGE₂ en la activación de las HSC *in vitro*. (A) WB representativo que muestra los niveles de hCOX-2, COL1A1 y α-SMA en la línea celular LX-2, tratadas con PGE₂ 5 μM TN y/o con TGF-β1 2 ng/ml durante 6 horas. Para el análisis de la densitometría, los valores se han representado frente al valor del control (Ctrl), y se ha utilizado GAPDH como control de carga. (B y C) WB representativos que muestran los niveles de hCOX-2, α-SMA, p-Akt, p-p38, p-ERK y p-IkBα en las células LX-2, tratadas con PGE₂ 5 μM y diferentes inhibidores farmacológicos (B) (20 μM LY294002, 1 μM Gö6983, 0.4 μM CMI, 0.5 μM BRIB796, 50 μM PD98059 y 10 μM BAY11-7085) o antagonistas de los receptores EP (C) (1 μM Ant. EP2 (TG4-155) y 25 μM Ant. EP4 (GW627368X)) durante 12 horas. Se ha utilizado GAPDH como control de carga. Los datos se representan como la media ± E.E. de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ vs. control; # $P < 0.05$ vs. TGF-β1.

4.2. Análisis del patrón de expresión de miARNs hepáticos en las líneas transgénicas para COX-2, y su papel en el desarrollo y evolución de la fibrosis hepática.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con respecto a la fibrosis, se planteó como objetivo estudiar en mayor profundidad el mecanismo mediante el cual PGE₂ protege frente a la fibrosis hepática. En un trabajo previo del grupo se observó que COX-2 es capaz de regular el procesamiento de miARNs implicados en la señalización hepática de la insulina (113). Por tanto, se analizó la participación de los miARNs y su relación

con PGE₂ dependiente de COX-2 en la fibrosis. Tras realizar un análisis por *microarray*, se eligieron aquellos miARNs que se expresan de forma diferencial en las HSC de los ratones hCOX-2-Tg frente a los Wt, en un modelo de fibrosis hepática inducida con CCl₄. Como resultado, se ha observado que PGE₂ dependiente de COX-2 disminuye la fibrosis hepática en modelos murinos, mediante la regulación de miR-23a-5p y miR-28a-5p.

A continuación, se muestran más detalladamente los resultados obtenidos en este segundo objetivo del trabajo.

4.2.1. La expresión constitutiva de COX-2 en el hepatocito inhibe la expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p en las HSC en un modelo de fibrosis hepática inducida por CCl₄.

En la primera parte de este trabajo, se observó que COX-2 presenta un papel protector frente a la fibrosis, tanto en los ratones hCOX-2-Tg, como en las HSC aisladas de estos animales. Para analizar la implicación de los miARNs en este proceso, se realizó un *array* de miARNs en las HSC aisladas de los animales Wt y hCOX-2-Tg tras el tratamiento con CCl₄. Como el CCl₄ es el compuesto que induce la fibrosis en este modelo, se han comparado los resultados obtenidos en los ratones hCOX-2-Tg frente a los Wt en esta condición. El análisis del *array* reveló que la expresión de 11 miARNs disminuyó en los ratones hCOX-2-Tg, mientras que la expresión de miR-29a-3p aumentó ($P \leq 0.05$; corte (*fold change*) ≥ 1.5) (Figura 22A). Posteriormente, se seleccionaron 4 miARN. Se escogieron miR-29a-3p (anti-fibrótico) y miR-199a-3p (pro-fibrótico) como controles, debido a que su papel en la fibrosis hepática se conoce bien (132), y los dos miARN con una diferencia más significativa (miR-23a-5p y miR-28a-5p). Para determinar su papel en la fibrosis hepática, y validar los resultados obtenidos en el *array*, se analizó su expresión en HSC primarias aisladas de los ratones Wt y hCOX-2-Tg tras un tratamiento con CCl₄, mediante RT-PCR (Figura 22B). Se observó una disminución de miR-23a-5p, miR-28a-5p y miR-199a-3p, y un aumento en miR-29a-3p en los ratones hCOX-2-Tg frente a los Wt. Esto indica que la expresión constitutiva de COX-2 en el hepatocito inhibe la expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p en las HSC. De igual forma, los niveles de miR-23a-5p y miR-28a-5p en suero tienden a disminuir en los hCOX-2-Tg (Figura 22F).

De forma adicional, se analizó la expresión de estos miARNs en extractos de hígado, en hepatocitos y en células de Kupffer aislados de estos mismos animales tratados

4. Resultados

con CCl₄. No se detectaron cambios significativos en su expresión en las células de Kupffer (Figura 22D) y el hígado (Figura 22E) de estos ratones. Sin embargo, se observó un efecto contrario en la expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p en los hepatocitos (Figura 22C), respecto a lo visto en las HSC.

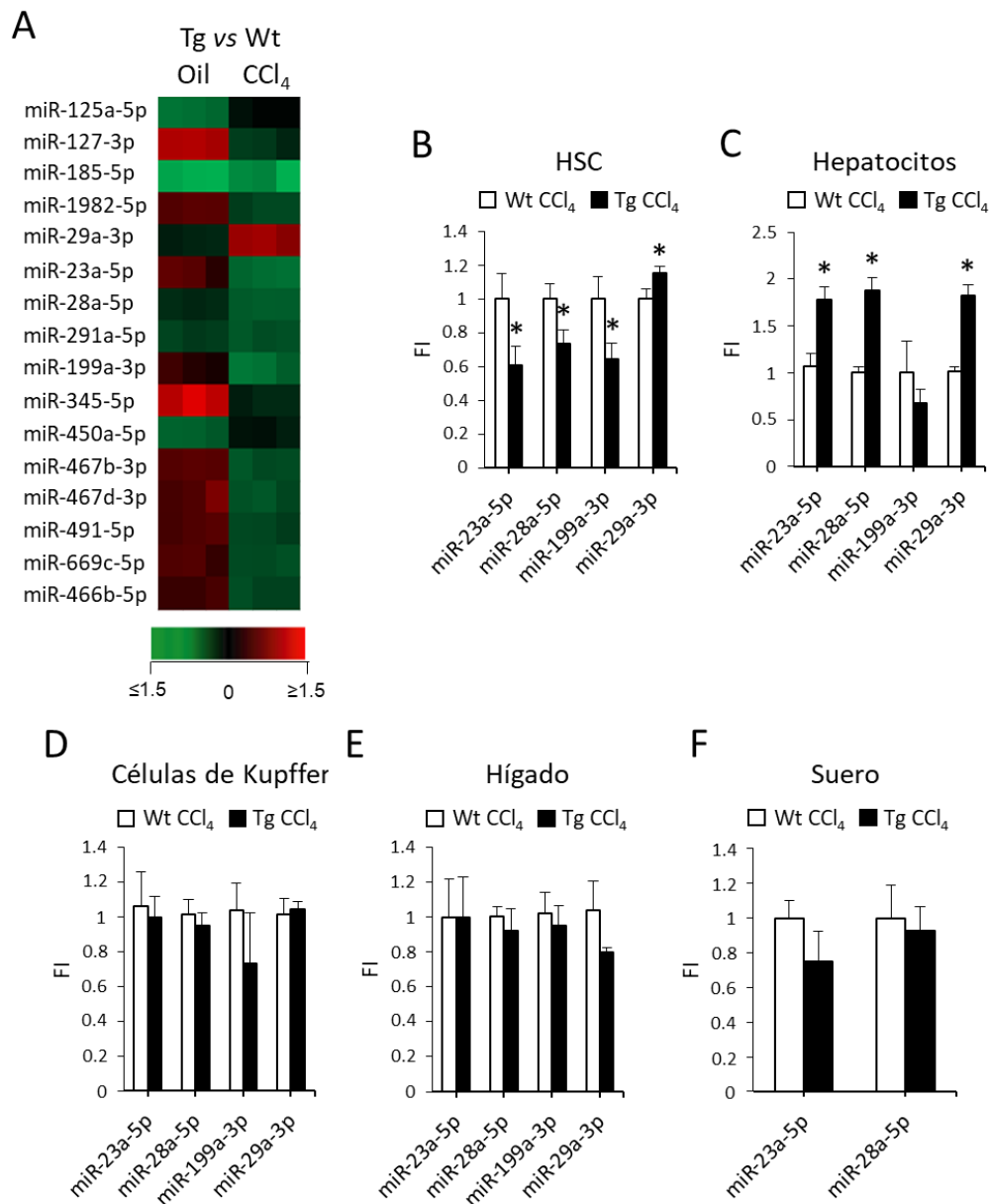


Figura 22. Expresión de miR-23a-5p, miR-28a-5p, miR-199a-3p y miR-29a-3p en los ratones Wt y hCOX-2-Tg. (A) Identificación de 16 miARNs que se expresan de forma diferencial en las HSC de los ratones Wt y hCOX-2-Tg tratados con Oil o CCl₄ durante 9 sem., analizados mediante un *array* de RT-PCR. Los valores de los triplicados se han representado en un “*heatmap*” frente a su expresión en el ratón Wt, tras el tratamiento con Oil o CCl₄. (B, C, D, E, F) Expresión de los miARNs elegidos en las HSC (B), hepatocitos (C), células de Kupffer (D), hígado total (E) y suero (F) aislados de los ratones Wt y hCOX-2-Tg, analizados mediante RT-PCR. Los valores se han normalizado frente a la media de la expresión del ARN de miR-191-5p, miR-103a-3p y

RNU5G (**B, C, D, E**), o de UniSp2 (**F**) y se han expresado como FI frente al valor del Wt CCl₄. Los datos se representan como la media \pm E.E. de 14-18 (**B**); 5-7 (**C**); 4 (**D, E, F**) ratones por grupo. * $P < 0.05$ vs. Wt CCl₄.

Para confirmar estos resultados, se utilizó otro modelo murino para inducir fibrosis en los ratones Wt y hCOX-2-Tg. Se sometió a los animales a BDL o a un procedimiento quirúrgico similar sin ligar el conducto (controles, Sham), y tras 21 días se sacrificaron, extrayendo el hígado o aislando las HSC para su análisis. En primer lugar, se determinó el grado de fibrosis hepática. Para ello, se realizaron tinciones de varias secciones de los hígados de estos animales con H&E, MTC y Rojo Sirio, que fueron evaluadas por un patólogo experimentado (Figura 23A). El análisis histopatológico reveló que tras el procedimiento BDL, tanto los ratones Wt como los hCOX-2-Tg presentaron un elevado grado de fibrosis, aunque siendo éste significativamente menor en los ratones hCOX-2-Tg. También se midieron los niveles plasmáticos de actividad de ALT, AST y bilirrubina cuyo análisis apoya que el daño es menor en los ratones hCOX-2-Tg, frente a lo observado en los Wt (Figura 23B). Además, se analizaron los niveles de α -SMA y COL1A1 mediante inmunohistoquímica fluorescente en secciones de los hígados de estos animales. Ambas proteínas aumentaron mucho en los animales Wt sometidos a BDL, mientras que en los ratones hCOX-2-Tg, el aumento fue menor. (Figura 23D). Los resultados obtenidos en este segundo modelo indican que la expresión constitutiva de COX-2 en el hepatocito protege a los animales hCOX-2-Tg frente a la fibrosis hepática inducida por BDL.

Posteriormente, se analizó la expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p en las HSC aisladas de los animales Wt y hCOX-2-Tg sometidos a BDL. Al igual que en el modelo de CCl₄, se observó una disminución de los niveles de estos miARNs en los ratones hCOX-2-Tg, frente a los Wt (Figura 23C). Todo esto apoya la hipótesis de que estos miARNs presentan un papel pro-fibrótico, y que su regulación por parte de PGE₂ parece tener un papel importante en la fibrosis hepática en modelos murinos.

4. Resultados

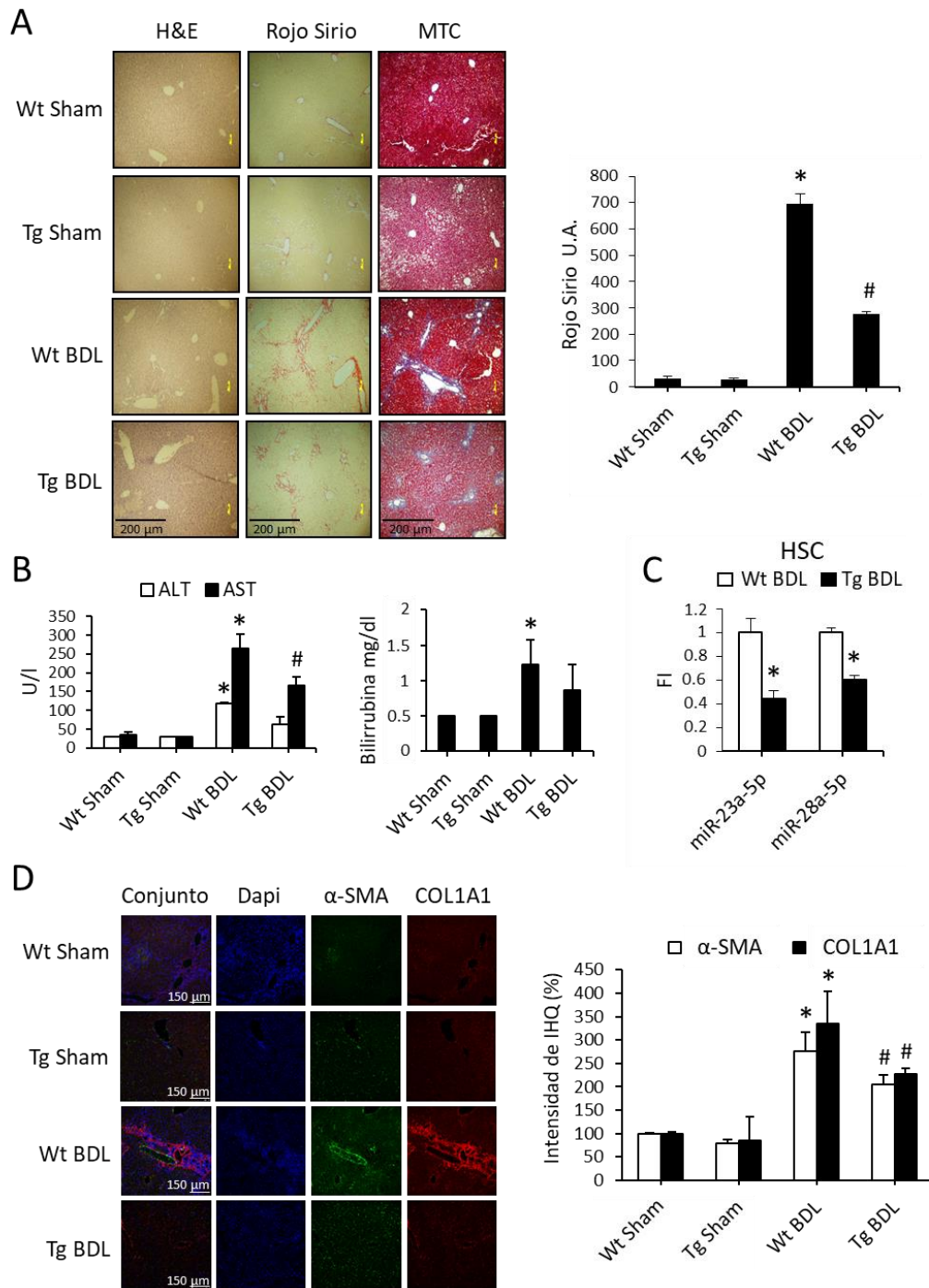


Figura 23. *miR-23a-5p* y *miR-28a-5p* se expresan de forma diferencial en los ratones *hCOX-2-Tg* tras el procedimiento de BDL. (A) Imágenes representativas de tinciones con H&E, MTC y Rojo Sirio realizadas en varias secciones de los hígados de ratones Wt y *hCOX-2-Tg*, tras haber sido sometidos a BDL. Los valores del Rojo Sirio se han representado en U.A. * $P < 0.05$ vs. Wt Sham. # $P < 0.05$ vs. Wt BDL. (B) Niveles plasmáticos de actividad de ALT, AST (U/l) y bilirrubina (mg/dl) en los ratones Wt y *hCOX-2-Tg* tras haber sido sometidos a BDL. * $P < 0.05$ vs. Wt Sham. # $P < 0.05$ vs. Wt BDL. (C) Expresión de *miR-23a-5p* y *miR-28a-5p* en las HSC aisladas de los ratones Wt y *hCOX-2-Tg* tras BDL, analizada mediante RT-PCR. Los valores se han normalizado frente a la media de la expresión de *miR-191-5p*, *miR-103a-3p* y *RNU5G*, y se han expresado como FI frente al Wt BDL. Los datos se representan como la media \pm E.E. (n=3-4 ratones por grupo). * $P < 0.05$ vs. Wt BDL. (D) Inmunohistoquímica fluorescente representativa

de una tinción de α -SMA y COL1A1 (izqda.), en los ratones Wt y hCOX-2-Tg tras BDL. Valores relativos de su intensidad expresados en porcentaje (dcha.). * $P < 0.05$ vs. Wt Sham. # $P < 0.05$ vs. Wt BDL.

4.2.2. La expresión de PGE₂ revierte el aumento en la expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p inducido por TGF- β 1 en las HSC.

Los resultados previos indican que la expresión de PGE₂ inhibe la activación de las HSC tanto *in vivo* como *in vitro*. En este sentido, la regulación de miR-23a-5p y miR-28a-5p por parte de COX-2 parece tener relevancia en la fibrosis hepática *in vivo*. Se estudió si ocurre lo mismo *in vitro*, analizando si la activación de las HSC inducida por TGF- β 1 se revierte en presencia de PGE₂ mediante la regulación de la expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p. Se utilizaron dos líneas de células esteladas hepáticas, unas humanas (LX-2) y otras murinas (GRX), además de HSC primarias aisladas de ratones Wt, a las que se trató con PGE₂ 5 μ M TN y TGF- β 1 2 ng/ml 6 horas. En los resultados se observó que la expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p es significativamente menor en las células tratadas con TGF- β 1+PGE₂, respecto a los niveles de expresión observados en las células tratadas únicamente con TGF- β 1 (Figura 24A, B, C). También se analizaron por WB los niveles de las proteínas de COL1A1 y α -SMA en las HSC primarias, observándose que su aumento tras el tratamiento con TGF- β 1 se revierte en presencia de PGE₂ (Figura 24D). Esto demuestra que PGE₂ no solo disminuye la activación de las HSC, sino que también atenúa el aumento de los niveles de expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p inducidos por TGF- β 1 en estas células *in vitro*.

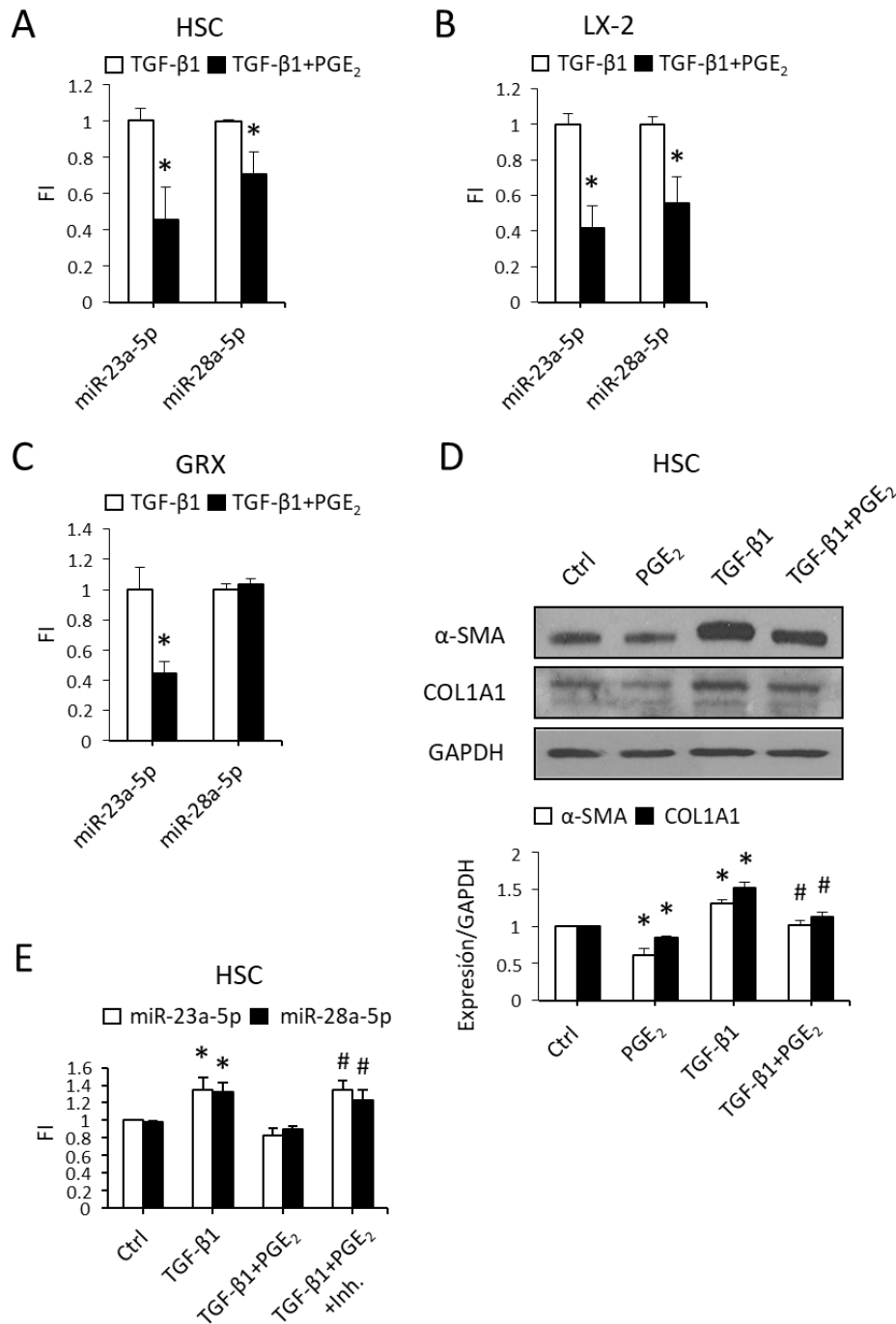


Figura 24. PGE₂ dependiente de COX-2 regula la expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p en las células esteladas hepáticas. (A, B, C) Validación de la disminución de la expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p en las HSC primarias (A), LX-2 (B) y GRX (C), analizados mediante RT-PCR. Las células se han tratado con PGE₂ 5 μM TN y con TGF-β1 2 ng/ml durante 6 horas. * $P < 0.05$ vs. células tratadas con TGF-β1. (D) WB representativo (arriba) de los niveles de α-SMA y COL1A1 en las HSC primarias tratadas con PGE₂ 5 μM y TGF-β1 2 ng/ml. Para el análisis de la densitometría, los valores se han representado frente al valor del Ctrl, y se ha utilizado GAPDH como control de carga. * $P < 0.05$ vs. Ctrl. # $P < 0.05$ vs. células tratadas con TGF-β1. (E) Expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p en las HSC primarias, tratadas con PGE₂ 5 μM, TGF-β1 2 ng/ml y el inhibidor (inh.) TβR-I (LY364947) 3 μM, analizada mediante RT-PCR. Los valores

se han normalizado frente a la media de la expresión de miR-191-5p, miR-103a-3p y RNU5G, y se han expresado como FI frente al Ctrl. Los datos se representan como la media \pm E.E. de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ vs. Ctrl. # $P < 0.05$ vs. células tratadas con TGF- β 1+PGE₂.

A continuación, se evaluó cómo ejerce su efecto PGE₂. Para analizar la posible implicación de la vía de señalización de TGF- β 1, se trató a las HSC primarias con un inhibidor del receptor de TGF- β 1 (T β R-I, LY364947) 3 μ M, de forma adicional a PGE₂ y TGF- β 1. Los resultados mostraron que, tras el tratamiento con el inhibidor, PGE₂ no es capaz de revertir el aumento producido por TGF- β 1 en la expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p (Figura 24E). Estos resultados sugieren que la vía de señalización de TGF- β 1 tiene un papel importante en la regulación específica que ejerce PGE₂ sobre miR-23a-5p y miR-28a-5p en las HSC durante la fibrogénesis hepática.

En base a los resultados obtenidos en las Figuras 21A y 24D, tras tratar a las células LX-2 o HSC con PGE₂ y TGF- β 1, se propone que PGE₂ tiene un papel anti-fibrótico, al prevenir la activación de las HSC *in vitro*. Para reafirmar este efecto, se utilizó un modelo *in vitro* tratando de reproducir las condiciones que suceden en el modelo *in vivo* del ratón hCOX-2-Tg. Para ello, se trataron las HSC primarias aisladas de ratones Wt con un medio condicionado procedente de los hepatocitos aislados tras su cultivo durante 24 horas. Los hepatocitos se obtuvieron de los ratones Wt y hCOX-2-Tg sometidos a un tratamiento con Oil o CCl₄. En primer lugar, se comprobaron los niveles de PGE₂ presentes en este medio condicionado. Como se esperaba, estos niveles fueron más elevados en el medio de los hepatocitos procedentes de los ratones hCOX-2-Tg (Figura 25B). A continuación, se analizó mediante inmunofluorescencia la expresión de dos marcadores pro-fibróticos, α -SMA y COL1A1. De acuerdo con los demás resultados, se observó que su expresión disminuye en las HSC tratadas con el medio condicionado de los hepatocitos de los ratones hCOX-2-Tg, respecto a los Wt, en ambos tratamientos (Figura 25A). Por último, se analizaron los niveles de pSMAD2/3, y al igual que sucede con α -SMA y COL1A1, se observó que su expresión es significativamente menor en las HSC tratadas con el medio condicionado de los hepatocitos de los ratones hCOX-2-Tg (Figura 25C). Estos resultados confirman el papel de la expresión de COX-2 en el hepatocito durante la fibrogénesis hepática, atenuando la activación de las HSC.

4. Resultados

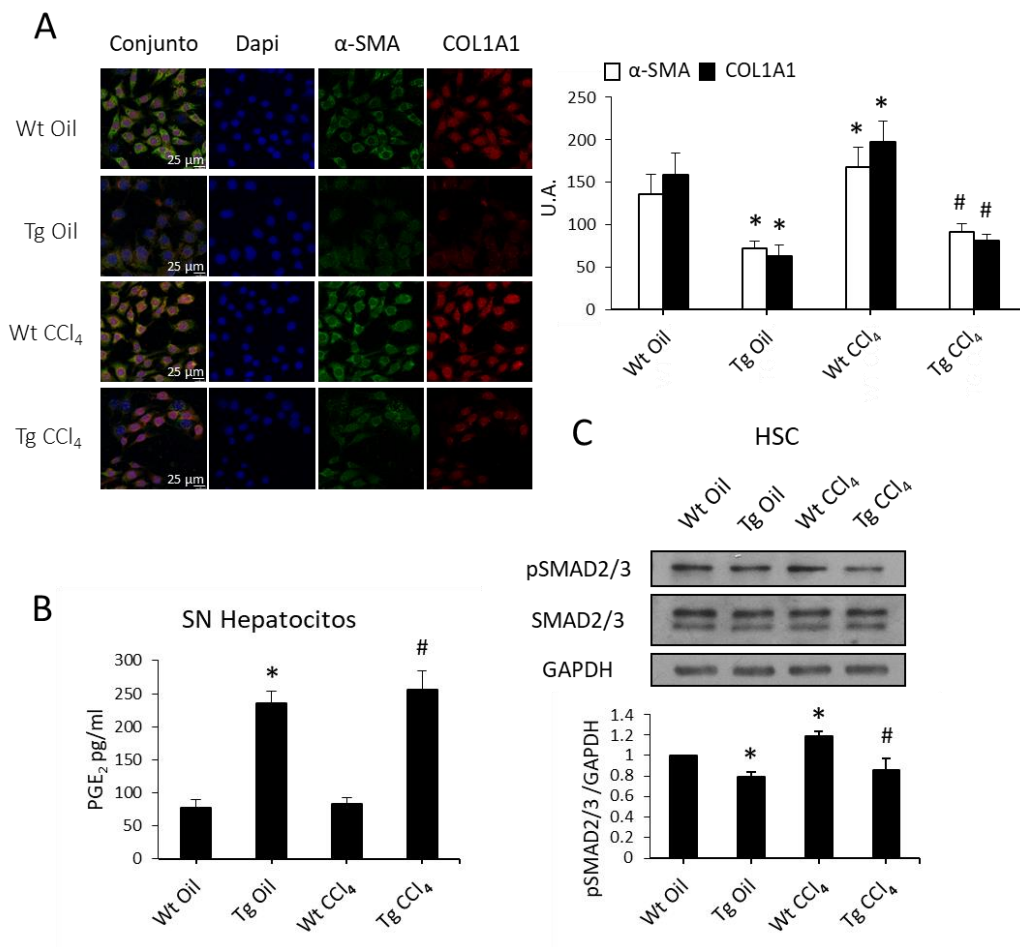


Figura 25. El medio condicionado de los hepatocitos aislados de los ratones *hCOX-2-Tg* protege frente a la activación de las HSC. Las HSC primarias se han tratado con medio condicionado procedente de los hepatocitos aislados de los ratones Wt y *hCOX-2-Tg*, tratados con Oil o CCl₄. (A) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de α -SMA y COL1A1. Las células se analizaron mediante microscopía confocal y la intensidad de la fluorescencia se digitalizó y se cuantificó. Valores representados arriba a la derecha, en U.A. (B) Medida de los niveles de PGE₂ en el medio condicionado procedente de los hepatocitos aislados de los ratones Wt y *hCOX-2-Tg* tras 24 horas en cultivo. (C) WB representativo de los niveles de SMAD 2/3. Para el análisis de la densitometría, los valores se han representado frente al valor del Wt Oil, y se ha utilizado GAPDH como control de carga. Los datos se representan como la media \pm E.E. de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ vs. Wt Oil. # $P < 0.05$ vs. Wt CCl₄.

4.2.3. Relación entre los miARNs regulados por COX-2 y las vías de señalización de TGF- β 1 y apoptosis. Genes diana implicados.

Tras observar que la expresión de los miARN elegidos se encuentra regulada por PGE₂ dependiente de COX-2, se analizó en mayor profundidad el papel funcional de estos miARNs. Para ello, se realizó un análisis *in silico* de sus genes diana para determinar las vías de señalización en las que están implicados, y que por tanto podrían estar reguladas

por estos miARNs. En primer lugar, se utilizó la página web microrna.org, que contiene unos algoritmos de predicción que facilitan la búsqueda de los genes diana predictivos de cualquier miARN. Una vez determinada la identidad de estos genes diana, se procesaron utilizando el software de DAVID 6.7, diseñado para analizar qué vías de señalización se encuentran enriquecidas (66). Este análisis permite determinar los posibles efectos biológicos en los que se encuentran implicados miR-23a-5p y miR-28a-5p. Como resultado de este análisis, se representaron las diversas vías enriquecidas entre los genes diana de estos miARNs utilizando la base de datos KEGG, considerando solo las vías de señalización con un valor $P \leq 0.05$ (Figura 26A). Entre estas vías se incluyen las “vías de señalización en cáncer”, “adhesión focal”, “apoptosis” y “vía de señalización de TGF- β 1”, entre otras, estando muchas de ellas implicadas en la regulación de la fibrosis hepática.

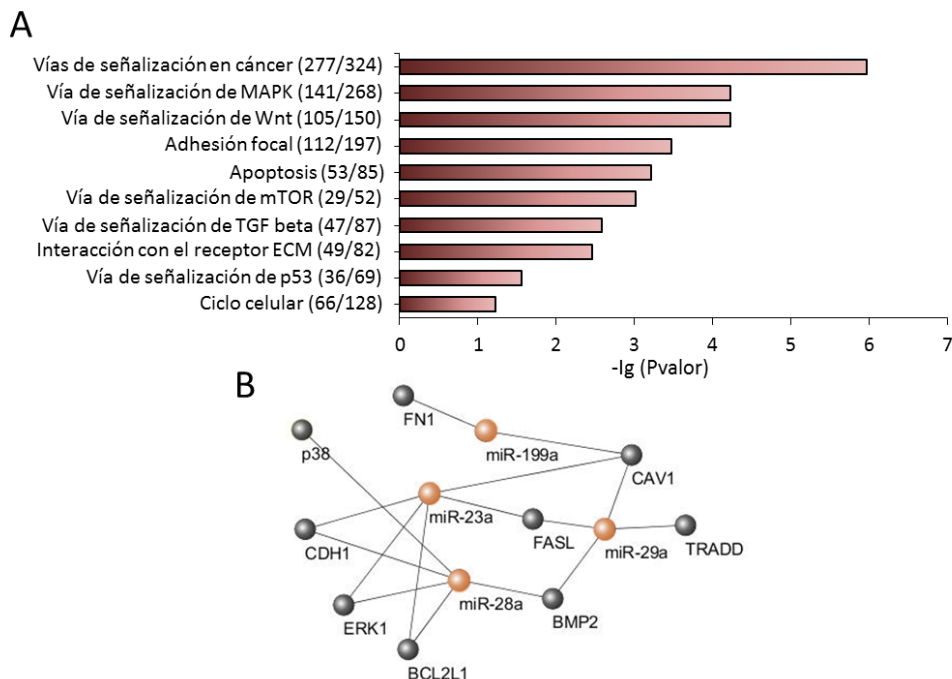


Figura 26. Enriquecimiento funcional de los genes diana predictivos de los miARN. (A) Representación de las rutas biológicas enriquecidas entre los genes diana de miR-23a-5p y miR-28a-5p, según la base de datos KEGG. Se han representado frente al \log_{10} negativo del Pvalor. El número de los genes diana y los genes totales para cada vía se muestran entre paréntesis. Se observa un enriquecimiento en las vías relacionadas con la muerte celular, los procesos basados en filamentos de actina, la proliferación y la fibrosis. (B) Interacciones entre los miARN escogidos anteriormente y sus genes diana. Se han representado utilizando el programa *Cytoscape*.

Para ilustrar las interacciones entre los miARN escogidos y algunos de estos genes diana, se utilizó el programa *Cytoscape* (Figura 26B). Los genes seleccionados

4. Resultados

pertencen a algunas de las vías afectadas, incluyendo la vía de apoptosis y la vía de señalización de TGF- β 1. Para determinar finalmente si estos genes diana participan o no en la regulación de la fibrosis hepática mediada por COX-2, se analizó su expresión mediante RT-PCR. Este análisis se realizó en las HSC aisladas de los ratones Wt y hCOX-2-Tg tratados con CCl₄ y en las HSC aisladas de los ratones Wt tratadas con PGE₂ 5 μ M TN y TGF- β 1 2 ng/ml 6 horas. En la Figura 27A se observa que, en ambos modelos, los niveles de expresión de los genes *Erk1*, *Bmp2* (proteína morfogenética ósea 2), *Cav1* (caveolina 1) y *Cdh1* (cadherina 1) se encuentran significativamente aumentados en presencia de PGE₂. Además, al transfectar las HSC primarias con miR-23a-5p y miR-28a-5p, sus niveles de expresión disminuyeron (Figura 27B). Estos datos indican que miR-23a-5p y miR-28a-5p participan en la regulación de la fibrosis hepática mediada por COX-2 modulando la expresión de estos genes diana implicados en las vías de apoptosis, proliferación y señalización de TGF- β 1.

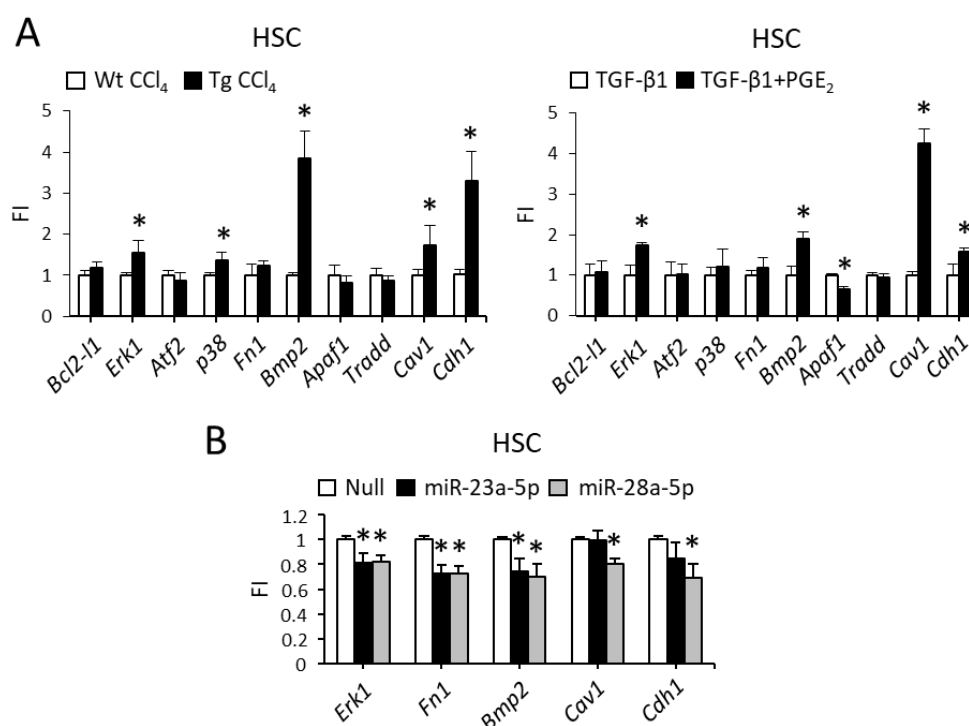


Figura 27. Expresión del ARNm de los genes diana de miR-23a-5p y miR-28a-5p en las HSC. (A) Expresión del ARNm de *Bcl2-l1*, *Erk1*, *Atf2*, *p38*, *Fn1*, *Bmp2*, *Apaf1*, *Tradd*, *Cav1* y *Cdh1* en las HSC aisladas de los ratones Wt y hCOX-2-Tg tratados con CCl₄ (izqda.), y en las HSC aisladas de los ratones Wt tratadas con PGE₂ 5 μ M y TGF- β 1 2 ng/ml (dcha.), analizada mediante RT-PCR. Los valores se han normalizado frente al ARNm de 36b4, y se han expresado como FI frente al Wt CCl₄ o TGF- β 1. * $P < 0.05$ vs. Wt CCl₄ (izqda.) o vs. células tratadas con TGF- β 1 (dcha.). (B) Expresión del ARNm de *Erk1*, *Fn1*, *Bmp2*, *Cav1* y *Cdh1* en HSC transfectadas, analizada mediante RT-PCR. Las HSC primarias se transfectaron con pEGP-miR Null, miR-23a-5p o miR-28a-5p durante 48 horas, utilizando Lipofectamina 2000. Los valores se han normalizado frente

al ARNm de 36b4, y se han expresado como FI frente a Null. Los datos se representan como la media \pm E.E. de 3-5/14-18 ratones por grupo (A izqda.) o \pm E.E. de tres experimentos independientes (A dcha., B). * $P < 0.05$ vs. Null.

4.2.4. PGE₂ disminuye la proliferación y aumenta la apoptosis en las HSC.

Teniendo en cuenta que los genes diana de miR-23a-5p y miR-28a-5p se encuentran implicados en las vías de apoptosis y proliferación, entre otras rutas biológicas, se analizó el efecto de PGE₂ en la apoptosis y proliferación de las HSC. Se utilizó el medio condicionado de los hepatocitos aislados de los ratones Wt y hCOX-2-Tg tratados con Oil y CCl₄ para incubar las HSC primarias, con el fin de reproducir de una forma más parecida lo que ocurre en el modelo *in vivo*. En primer lugar, se analizó la expresión de dos marcadores de proliferación celular, PCNA y Ki67, mediante inmunofluorescencia. Se observó que la presencia de PGE₂ en el medio condicionado de los hepatocitos de los ratones hCOX-2-Tg, fue capaz de inhibir la expresión de ambos marcadores en las HSC, que aumentaba tras incubar con el medio de los hepatocitos de los ratones tratados con CCl₄ (Figura 28A). Además, se realizó un ensayo de viabilidad en estas células (MTT), donde se confirmó que PGE₂ inhibe de forma significativa la proliferación en las HSC (Figura 28B).

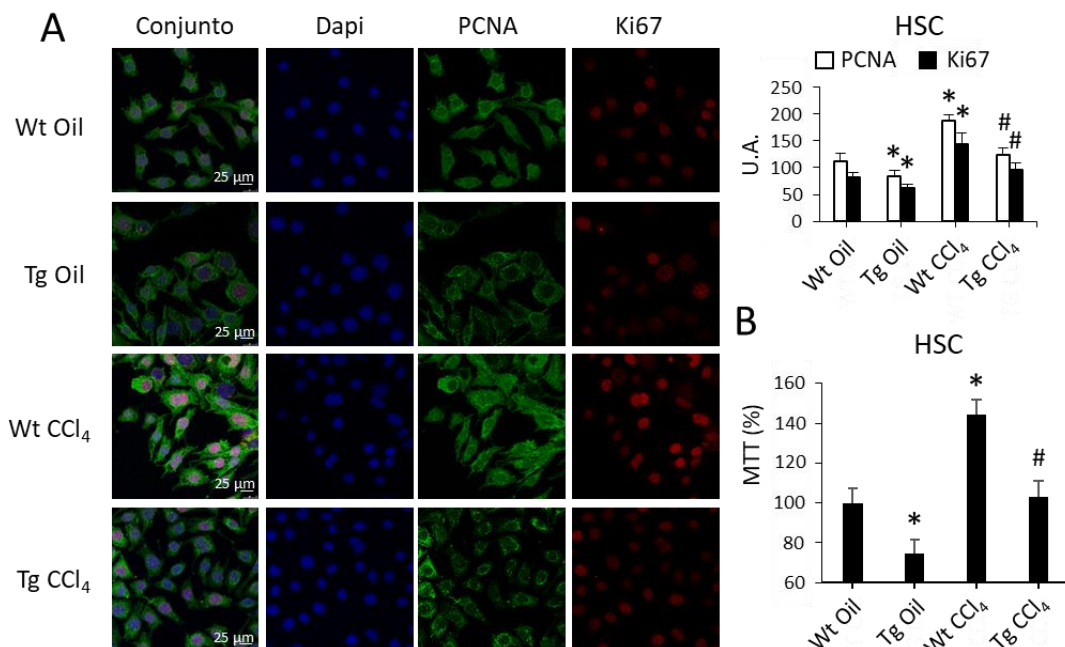


Figura 28. El medio condicionado de los hepatocitos aislados de los ratones hCOX-2-Tg disminuye la proliferación de las HSC. Las HSC primarias se trataron con el medio condicionado procedente de los hepatocitos aislados de los ratones Wt y hCOX-2-Tg, tratados con Oil o CCl₄.

4. Resultados

(A) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de PCNA y Ki67. Las células se analizaron mediante microscopía confocal y la intensidad de la fluorescencia se digitalizó y se cuantificó. Valores representados en U.A. (B) Experimento de MTT representado en porcentaje (Wt Oil es el 100%). Los datos se representan como la media \pm E.E. de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ vs. Wt Oil. # $P < 0.05$ vs. Wt CCl₄.

En base a estos resultados, se analizó si el efecto inhibitor de PGE₂ en la proliferación de las HSC estaba mediado por un aumento de la apoptosis en estas células. Se midieron los niveles de expresión de la Caspasa-3 activa mediante inmunofluorescencia, y se observó que su expresión aumentaba de forma significativa en las HSC tratadas con el medio de los hepatocitos aislados de los ratones hCOX-2-Tg (Figura 29A). Esto se confirmó mediante WB, y se obtuvo el mismo resultado para otra proteína pro-apoptótica, BAX (Figura 29B). Además, el resultado del análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo también reflejó un aumento de la apoptosis en las HSC de los ratones hCOX-2-Tg frente a los ratones Wt (Figura 30). En conjunto, estos resultados indican que la expresión de COX-2 en el hepatocito induce una disminución en la activación de las HSC, inhibiendo la proliferación y aumentando la apoptosis.

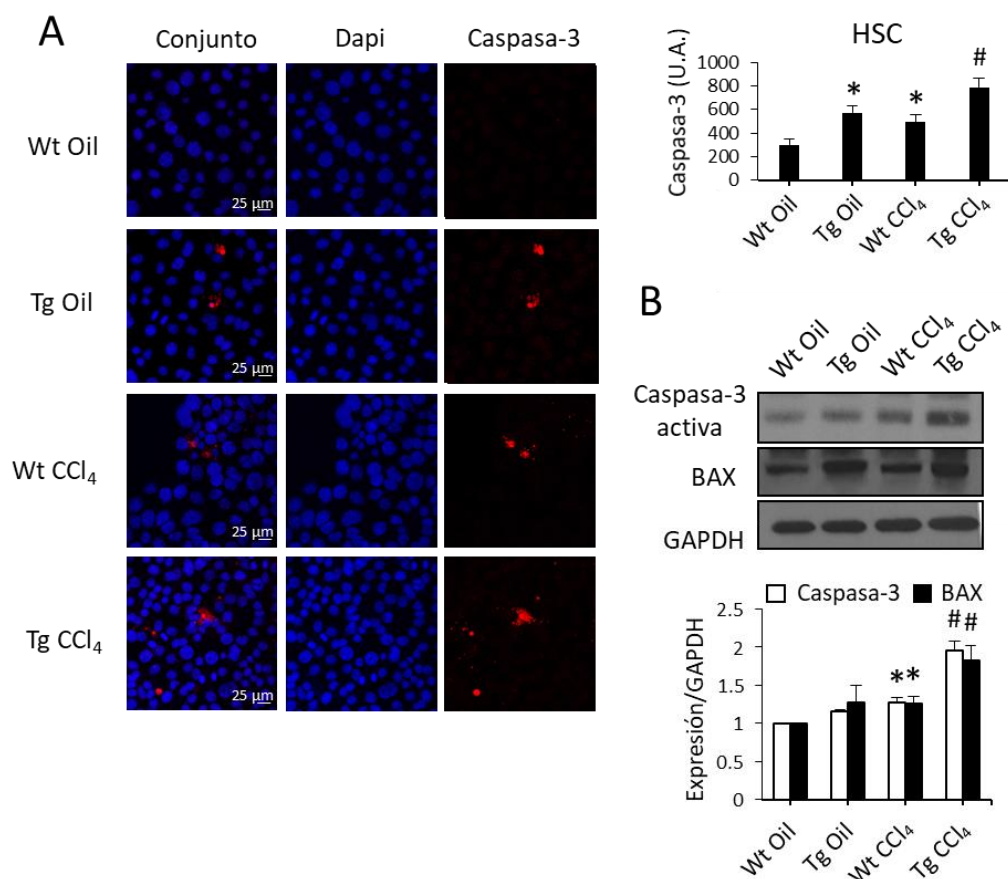


Figura 29. El medio condicionado de los hepatocitos aislados de los ratones hCOX-2-Tg induce la apoptosis en las HSC. Las HSC primarias se han tratado con el medio condicionado procedente

de los hepatocitos aislados de los ratones Wt y hCOX-2-Tg, tratados con Oil o CCl₄. (A) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de Caspasa-3. Las células se analizaron mediante microscopía confocal y la intensidad de la fluorescencia se digitalizó y se cuantificó. Valores representados en U.A. (B) WB representativo de los niveles de Caspasa-3 activa y BAX. Para el análisis de la densitometría, los valores se han representado frente al valor del Wt Oil, y se ha utilizado GAPDH como control de carga. Los datos se representan como la media \pm E.E. de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ vs. Wt Oil. # $P < 0.05$ vs. Wt CCl₄.

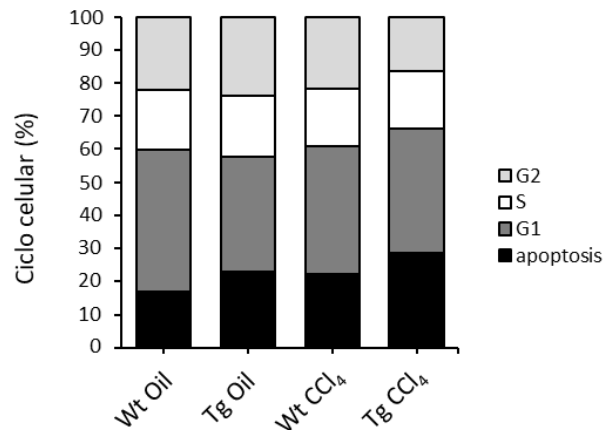


Figura 30. Las HSC primarias se han tratado con el medio condicionado procedente de los hepatocitos aislados de los ratones Wt y hCOX-2-Tg, tratados con Oil o CCl₄. Perfil representativo del ciclo celular, analizado mediante citometría de flujo. Los valores muestran el porcentaje de células en cada fase.

4.2.5. La sobreexpresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p induce la fibrosis hepática, mediante la activación de las HSC.

A continuación, se transfectaron las HSC primarias aisladas de los ratones Wt con un vector de expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p, de manera independiente o en combinación. Se comprobó la eficiencia de la transfección mediante el análisis de la expresión de GFP presente en el plásmido utilizado (*GFP-puromycin (pEGP)-miR cloning vector*) (Figura 31A), así como los niveles de expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p, mediante RT-PCR (Figura 31B).

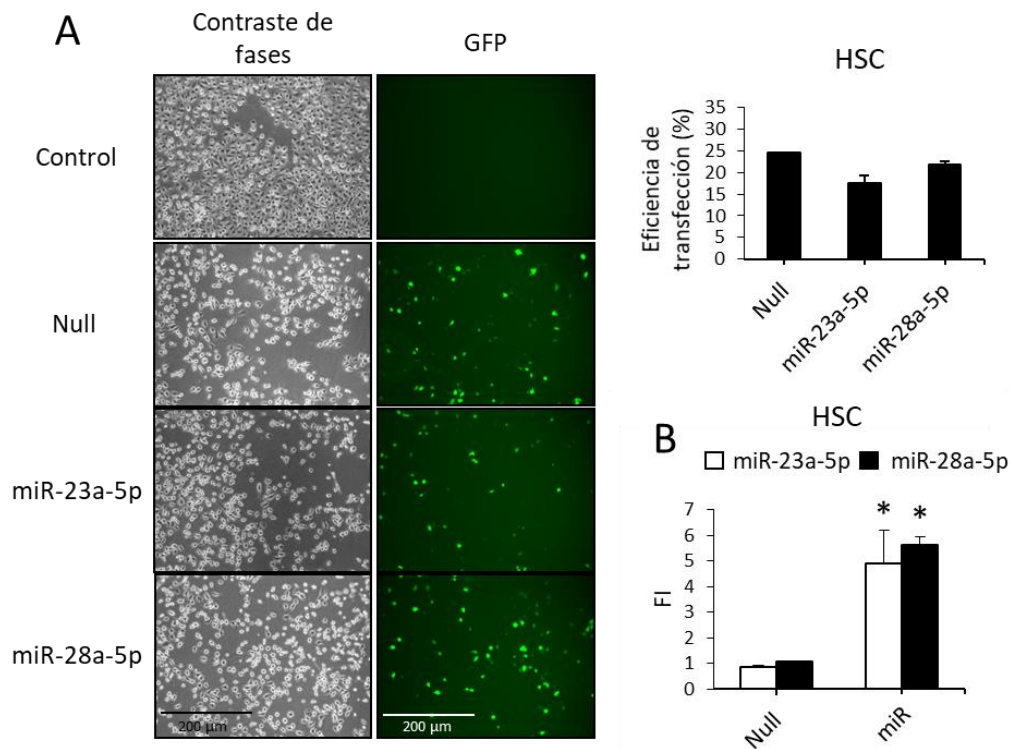


Figura 31. Las HSC primarias se transfectaron con pEGP-miR Null, miR-23a-5p o miR-28a-5p durante 48 horas, utilizando Lipofectamina 2000. **(A)** Imágenes representativas de la fluorescencia de GFP. Se muestran los valores de la eficiencia de la transfección (%). **(B)** Expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p en las HSC, analizada mediante RT-PCR. Los valores se han normalizado frente a la media de la expresión de miR-191-5p, miR-103a-3p y RNU5G, y se han expresado como FI frente al Null. Los datos se representan como la media \pm E.E. de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ vs. pEGP-miR Null.

Se observó que, tras la transfección de las HSC con ambos miARNs, la expresión de α -SMA y COL1A1 aumentó de forma significativa (Figura 32A), lo que apoya la hipótesis de que tanto miR-23a-5p como miR-28a-5p tienen un papel pro-fibrótico. Sin embargo, su efecto no parece ser sinérgico, ya que la expresión de ambos miARNs en combinación no da lugar a un mayor aumento de la expresión de los marcadores pro-fibróticos analizados.

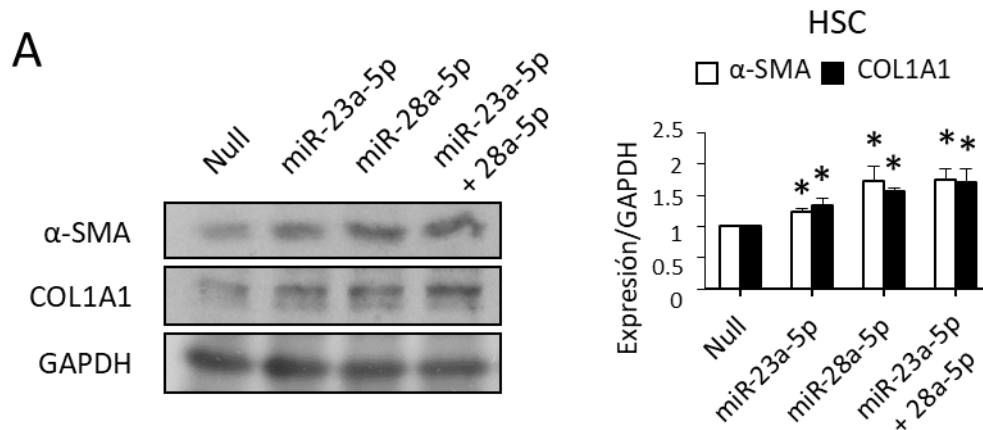


Figura 32. La sobreexpresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p induce la fibrosis en las HSC. Las HSC primarias se transfectaron con pEGP-miR Null, miR-23a-5p o miR-28a-5p durante 48 horas, utilizando Lipofectamina 2000. (A) WB representativo de los niveles de α -SMA y COL1A1. Para el análisis de la densitometría, los valores se han representado frente al valor de Null, y se ha utilizado GAPDH como control de carga. Los datos se representan como la media \pm E.E. de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ vs. Null.

Por otro lado, se trataron las HSC transfectadas con PGE₂ 5 μ M TN y TGF- β 1 2 ng/ml 6 horas, para determinar si la sobreexpresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p contrarresta el efecto anti-fibrótico, anti-proliferativo y pro-apoptótico de PGE₂ sobre las HSC. En primer lugar, se observó que PGE₂ disminuye la expresión de α -SMA y COL1A1. Sin embargo, esta inhibición se contrarresta al sobreexpresar miR-23a-5p y miR-28a-5p (Figura 33A). Del mismo modo, se analizó la expresión de diversos genes diana de los miARNs, implicados en la vía de apoptosis, señalización de TGF- β 1 y adhesión focal (ERK1, BMP2 y CDH1 respectivamente). Los resultados se ajustaron a lo esperado, ya que su expresión se incrementó tras un tratamiento con TGF- β 1+PGE₂, frente a lo observado con TGF- β 1, y la sobreexpresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p contrarresta este efecto (Figura 33A). A continuación, se analizó la proliferación de las HSC transfectadas mediante un ensayo de viabilidad (MTT). Se observó que la disminución en la proliferación causada por PGE₂ se contrarresta en parte al sobreexpresar los miARNs (Figura 33B). Además, la sobreexpresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p disminuye la apoptosis, ya que reduce la expresión de Caspasa-3 activa y aumenta la expresión de BCL-xL, comparado frente a lo observado con PGE₂ (Figura 33C). En conclusión, todos estos resultados indican que miR-23a-5p y miR-28a-5p modulan la inducción de la fibrosis hepática a través de la activación de las HSC. Su

4. Resultados

mecanismo de acción implica inhibición de la apoptosis y aumento de la proliferación y de la expresión de marcadores pro-fibróticos en las HSC.

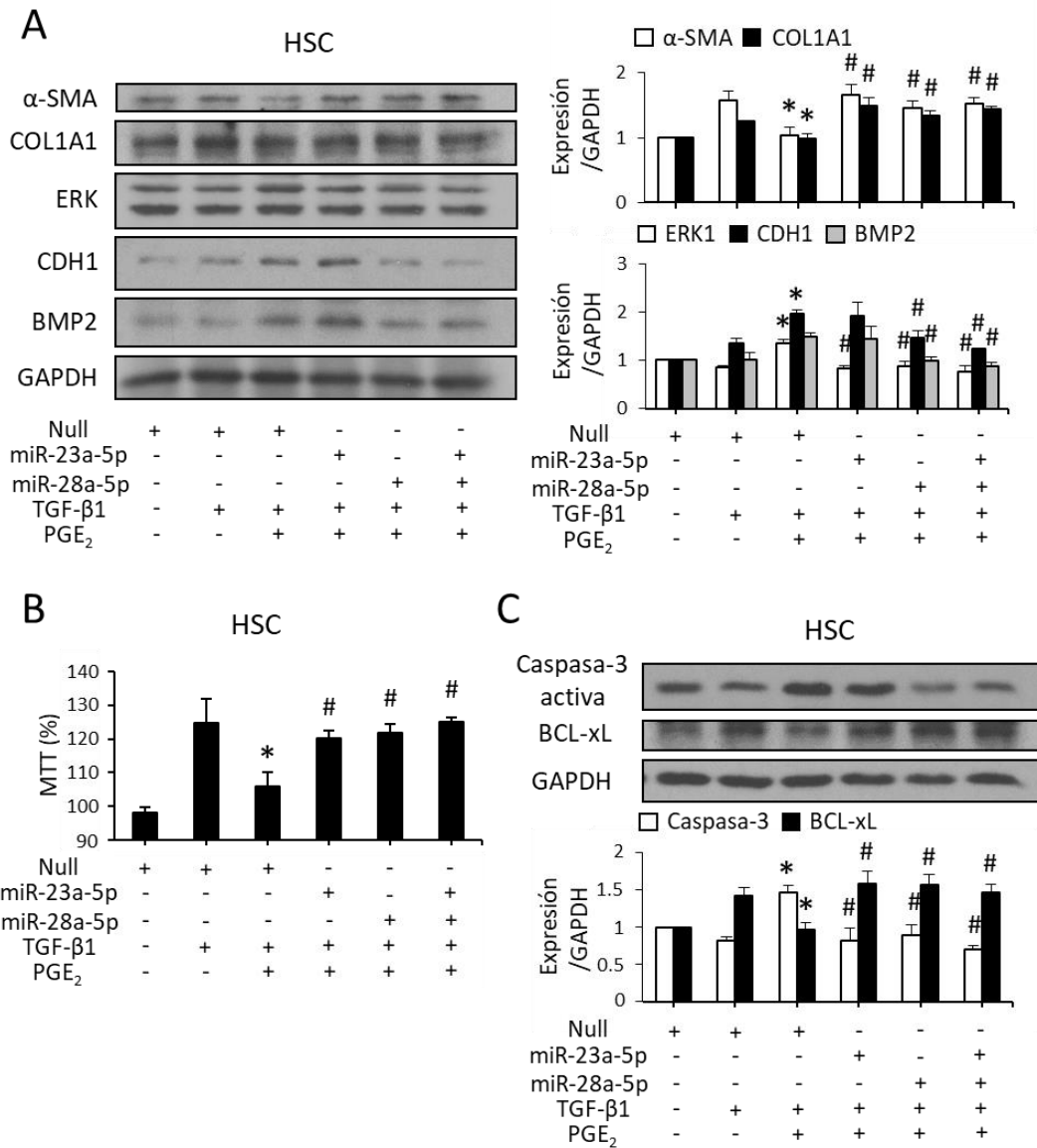


Figura 33. La sobreexpresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p contrarresta el efecto de PGE₂. Las HSC primarias se transfectaron con pEGP-miR Null, miR-23a-5p o miR-28a-5p durante 48 horas, utilizando Lipofectamina 2000. (A, B, C) Las células se trataron con PGE₂ 5 μ M y TGF- β 1 2 ng/ml, de forma adicional a la transfección. (A) WB representativo de los niveles de la proteína de α -SMA, COL1A1, ERK, CDH1 y BMP2. (B) Experimento de MTT representado en porcentaje (Null es el 100%). (C) WB representativo de los niveles de Caspasa-3 activa y BCL-xL. Para el análisis de la densitometría, los valores se han representado frente al valor de Null, y se ha utilizado GAPDH como control de carga. Los datos se representan como la media \pm E.E. de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ vs. TGF- β 1+Null; # $P < 0.05$ vs. TGF- β 1+PGE₂+Null.

4.3. Análisis de la expresión de COX-2 y los niveles de PGE₂ en biopsias hepáticas y sueros de pacientes con EHGNA y fibrosis.

A continuación, se muestran más detalladamente los resultados obtenidos en este tercer y último objetivo del trabajo.

4.3.1. Análisis de la expresión de COX-2 en biopsias hepáticas de pacientes con EHGNA. Relación con el progreso de la enfermedad.

Tras analizar la implicación de COX-2 en el desarrollo de la EHNA en modelos murinos, se quiso investigar su papel en pacientes con EHGNA (ENA y EHNA). El estudio incluyó a 34 pacientes con un HN y a 49 pacientes con EHGNA, los cuales se dividieron en dos grupos: 26 con ENA y 23 con EHNA. Se analizaron los niveles de ARNm de COX-2 en biopsias del hígado de estos pacientes. En la Figura 34A se observa un incremento en los niveles de ARNm de COX-2 en los pacientes con ENA y EHNA respecto a los HN. Al analizar los niveles de PGE₂ en el suero de estos pacientes, se encontró un aumento similar (Figura 34B). Además, se observó una correlación positiva entre los niveles de expresión de COX-2 en estos pacientes y su índice de actividad EHGNA (Figura 34C). Este aumento de la expresión de COX-2 y de los niveles de PGE₂ observado en los pacientes con ENA y EHNA se correlaciona con lo observado en los ratones alimentados con la dieta MCD (Figura 7A, B), en los que se apreció una clara tendencia a aumentar los niveles hepáticos de PGE₂. Sin embargo, teniendo en cuenta el papel protector de PGE₂ observado en el modelo murino, estos datos parecen indicar que los niveles elevados de PGE₂ endógena asociados con la progresión de la EHGNA actúan como un mecanismo de defensa frente a la enfermedad.

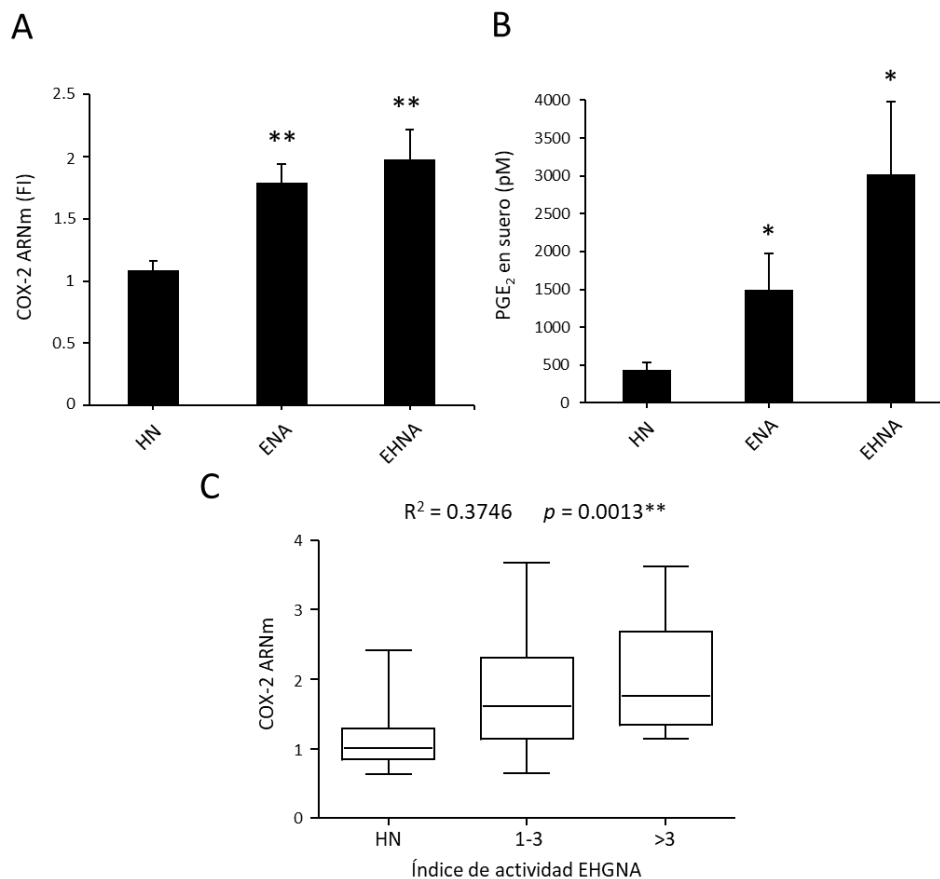


Figura 34. Expresión de COX-2 y niveles de PGE₂ en pacientes con ENA y EHNA. (A) Expresión del ARNm de COX-2 en biopsias hepáticas de pacientes con un HN, ENA y EHNA, analizado por RT-PCR. Los valores se han normalizado frente al ARNm de 36b4, y se han expresado como FI frente al HN. (B) Medida de los niveles de PGE₂ en el suero de estos pacientes. (C) Correlación entre los niveles de COX-2 hepáticos y el índice de actividad EHNA. Se han calculado el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de correlación de Pearson (p). ** $P < 0.01$ vs. HN; * $P < 0.05$ vs. HN.

4.3.2. Análisis de los niveles de PGE₂ y de la expresión de miARNs en sueros de pacientes con fibrosis. Relación con el progreso de la enfermedad.

Para finalizar, tras haber determinado la implicación de miR-23a-5p y miR-28a-5p en la fibrosis hepática, se analizó su expresión en sueros procedentes de pacientes con fibrosis. El estudio incluyó a 13 pacientes con un HN (con fibrosis grado 0) y a 25 pacientes no diabéticos, a los cuales se les había diagnosticado fibrosis (de grado I hasta grado III). De forma similar a los resultados obtenidos previamente en los pacientes con EHNA, se observó un aumento en los niveles de PGE₂ a medida que progresa la fibrosis hepática (Figura 35A). Sin embargo, aunque no se detectaron cambios significativos en

los niveles de miR-23a-5p, se observó una disminución en la expresión de miR-28-5p, cuyos valores se correlacionan de forma inversa con lo observado en los niveles de PGE₂ (Figura 35B, C). Estos datos sugieren que la regulación de miR-28-5p mediada por PGE₂ observada en los modelos murinos de fibrosis hepática, podría ocurrir de manera similar en los pacientes con fibrosis.

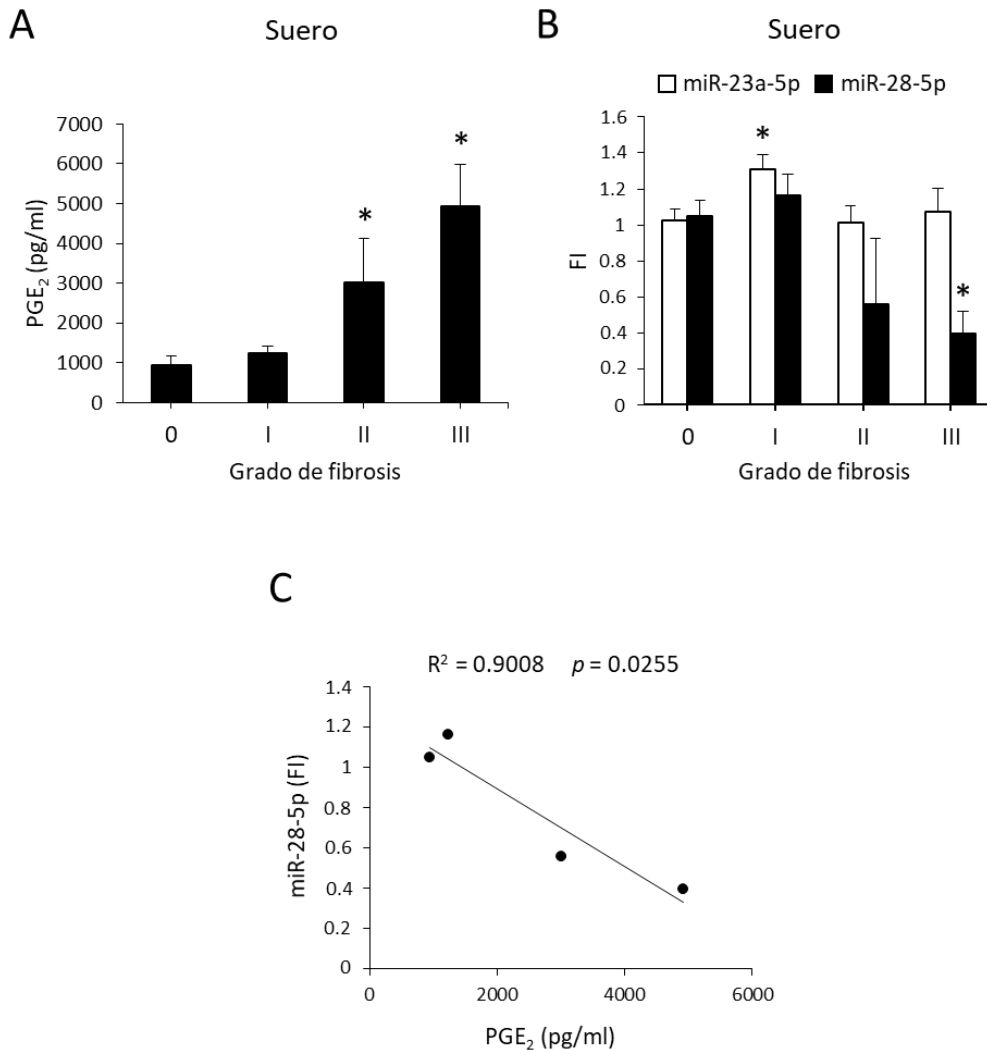


Figura 35. Los niveles de PGE₂ aumentan y se correlacionan de forma inversa a los niveles de miR-28-5p en el suero de pacientes con fibrosis hepática. (A) Medida de los niveles de PGE₂ en el suero de pacientes con diferentes grados de fibrosis. * $P < 0.01$ vs. HN (grado cero). (B) Expresión de miR-23a-5p y miR-28-5p en el suero de estos pacientes, analizada mediante RT-PCR. Los valores se han normalizado frente a la expresión del ARN de UniSp2, y se han expresado como FI frente al grado cero. Los datos se representan como la media \pm E.E. (n=3-19 pacientes por grupo). * $P < 0.05$ vs. Grado cero. (C) Correlación entre los niveles de PGE₂ y la expresión de miR-28-5p. Se han calculado el R^2 y el p .

5. Discusión

La implicación de las PGs dependientes de COX-2 en la EHNA y la fibrosis hepática es un tema controvertido y materia de debate. Algunos estudios señalan que la acción de las PGs favorece el desarrollo de estas enfermedades (78, 122, 169), mientras que otros indican que su efecto es beneficioso, presentando un papel hepato-protector (67, 68, 73). Por otro lado, hay un estudio que afirma que COX-2 no media el desarrollo de la fibrosis hepática, ya que, tras utilizar un modelo de ratón transgénico para COX-2, no observaron diferencias entre los ratones Wt y Tg (170). Todas estas discrepancias en torno a la función de COX-2 podrían deberse en parte a que los modelos experimentales utilizados son muy variados. Sin embargo, hay trabajos en los que, incluso utilizando el mismo modelo, se han observado resultados contradictorios. Un ejemplo de esto último son dos estudios donde se ha utilizado celecoxib (inhibidor selectivo de COX-2) en ratas tratadas con TAA. El efecto observado de celecoxib sobre la fibrosis hepática inducida por TAA es contrario al comparar entre ambos trabajos (68, 122). La utilización de inhibidores selectivos para COX-2 también puede ser la causa de algunas de estas controversias, ya que estos inhibidores son capaces de afectar a la expresión de otros genes a través de vías independientes de COX-2 (6, 134). En este sentido, Wang y colaboradores (153) han demostrado que un inhibidor de COX-2, rofecoxib, inhibe la expresión del factor fibrogénico CTGF (factor de crecimiento del tejido conectivo), y por tanto, la activación de las HSC y la producción de colágeno. Sin embargo, esto contrasta con otro trabajo que indica que la acción del NS398, otro inhibidor de COX-2, induce la expresión de colágeno en HSC, mientras que un tratamiento con PGE₂ exógena lo inhibe (67). Con el objetivo de profundizar en el estudio, y tratando de evitar las controversias o limitaciones que pueden generar los inhibidores farmacológicos de COX-2, en el presente trabajo se ha utilizado un modelo de ratón transgénico portador del gen COX-2 humano, que se expresa selectivamente en el hepatocito. En trabajos previos del grupo, se observó que, utilizando este mismo modelo, PGE₂ dependiente de COX-2 presenta un papel protector frente al daño hepático, esteatosis, obesidad y resistencia a la insulina (20, 46, 107). En base a estos resultados, se planteó la hipótesis de que COX-2 podría tener un efecto protector en otras enfermedades hepáticas como la EHNA y la fibrosis.

La EHNA es parte de la EHGNA, apareciendo como resultado de la progresión de esta patología. Se caracteriza por un aumento de la inflamación lobular y portal, daño hepatocelular y en última instancia, fibrosis hepática (163). Para analizar el papel de COX-2 en la EHNA, se ha utilizado un modelo murino de dieta MCD. A pesar de que el perfil metabólico de los animales tratados no es idéntico al observado en la EHNA en

humanos, este modelo es capaz de reproducir sus principales características histológicas en menos tiempo que con otras dietas (rápida aparición de esteatosis, inflamación, estrés oxidativo y apoptosis) (69, 148). La eficacia del modelo se confirma en los ratones Wt tratados con esta dieta, ya que presentan estas características.

Se ha observado que las prostaglandinas derivadas de la acción de COX-2 disminuyen el daño hepático (“*ballooning*”, inflamación e índice de actividad EHGNA) y la esteatosis en los ratones hCOX-2-Tg. Esta función protectora se ve reforzada por otros resultados del grupo, donde se observó que, tras utilizar un modelo de dieta grasa (HFD), la acción de COX-2 no solo protege frente a la esteatosis hepática, sino también frente a otros parámetros (como obesidad, RI, adiposidad e inflamación) (46). Por otro lado, se ha observado que la esteatohepatitis inducida por la dieta MCD se revierte durante las primeras semanas si tras la misma, los ratones ingieren de nuevo una dieta RCD (70). Esta reversión del daño se confirmó en los ratones Wt, ya que recuperaron en parte los niveles de P.C., ALT y el índice de actividad EHGNA, que habían empeorado tras la dieta. En los ratones hCOX-2-Tg esta recuperación fue mayor. En el presente trabajo también se ha observado que los ratones hCOX-2-Tg presentan un menor grado de inflamación. La inflamación es un proceso complejo que, en exceso o con un desarrollo crónico, no solo empeora el daño hepático, sino que también puede llegar a promover la fibrosis y la carcinogénesis hepática. Su presencia es característica de muchas enfermedades hepáticas, entre ellas la EHNA, como se ha mencionado anteriormente (13). MCP-1 y su receptor, CCR2, son las principales moléculas que median la infiltración y el reclutamiento de macrófagos en el hígado. Se ha observado que las células de Kupffer (macrófagos residentes) son la principal fuente de MCP-1, mientras que CCR2 se expresa sobre todo en los macrófagos infiltrados (112). La importancia de ambas moléculas en el desarrollo del proceso inflamatorio no se ha visto solo en un modelo de EHNA inducido por la dieta MCD, donde al inhibir MCP-1 se atenúan la esteatosis y la inflamación inducidas por la dieta (3), sino también en otro modelo de EHNA inducido por una dieta deficiente en colina (111), un modelo de obesidad inducido por una dieta HFD (119), e incluso en un modelo de fibrosis inducida por CCl₄ (76, 110). En estos modelos se ha contemplado que la falta de receptor CCR2 disminuye el daño hepático, además de la esteatosis, la fibrosis, la infiltración de macrófagos o la expresión de diversas citoquinas pro-inflamatorias. En el presente trabajo, la importancia del papel protector de COX-2 frente a la inflamación se pone de manifiesto por el aumento del proceso inflamatorio en los ratones Wt, tras el tratamiento con la dieta MCD. Los niveles

de MCP-1 y de monocitos infiltrados Ly6C⁺ aumentan con la dieta, además de la presencia de células CCR2⁺, reflejando un aumento de la infiltración de células inflamatorias con su correspondiente efecto en el proceso patológico. Sin embargo, en los ratones hCOX-2-Tg, la expresión constitutiva de COX-2 hepática atenúa los niveles de todos estos factores pro-inflamatorios, incluyendo la expresión sistémica de citoquinas pro-inflamatorias. De forma similar, en un trabajo previo del grupo, se indica que COX-2 disminuye la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 o TNF- α , tras someter a los animales a una dieta HFD (46). Este papel protector de PGE₂ frente a inflamación no se observa solo en hígado, sino también en el músculo esquelético, donde atenúa la inflamación inducida por ácidos grasos (35); en fibroblastos pulmonares humanos, donde modula la liberación de MCP-1 (131); o en macrófagos peritoneales, donde su inhibición aumenta la aterosclerosis mediante un aumento de TNF- α (59). Sin embargo, el papel de COX-2 en el contexto inflamatorio también presenta controversias, ya que hay estudios en los que se afirma que el efecto de COX-2 favorece la inflamación (53, 169). Sin contar con que su expresión se induce por estímulos pro-inflamatorios como TNF- α o IL-1 β , lo que no implica que su papel sea pro-inflamatorio, sino que sugiere que su regulación es compleja dependiendo del estímulo y del contexto celular (61). Por otro lado, en este trabajo se ha observado que COX-2 atenúa la respuesta inflamatoria inducida por la dieta MCD a través de la inhibición de la vía de NF- κ B y la peroxidación de lípidos. Finalmente, respecto a la apoptosis, los resultados obtenidos en los ratones Wt tratados con la dieta MCD concuerdan con la revisión de Cazanave & Gores (22), donde se ha demostrado que la muerte celular de los hepatocitos es un proceso clave en la patogénesis de la EHNA. También se ha señalado su relación con el proceso inflamatorio, ya que el desarrollo de la EHNA inducido por la activación de caspasa 3 se encuentra en parte mediado por la infiltración de los monocitos circulantes Ly6C⁺ (150). A pesar de las controversias existentes en cuanto al efecto de COX-2 sobre la apoptosis de los hepatocitos durante el desarrollo de la EHNA (30, 164), los datos obtenidos en el presente trabajo indican que COX-2 presenta un papel anti-apoptótico, como lo demuestran la disminución de la relación Bax/Bcl-xL, el aumento de Mcl-1 y la disminución de la actividad de la caspasa-3. La acción de COX-2 sobre la actividad de caspasa 3 se ha analizado en diversos modelos de daño hepático (42, 45, 107), y los resultados obtenidos apoyan esta hipótesis. En resumen, se puede afirmar que la expresión

de COX-2 en el hepatocito protege frente a la EHNA inducida por una dieta MCD, dado su papel anti-inflamatorio, anti-apoptótico y anti-oxidante observado (Figura 36).

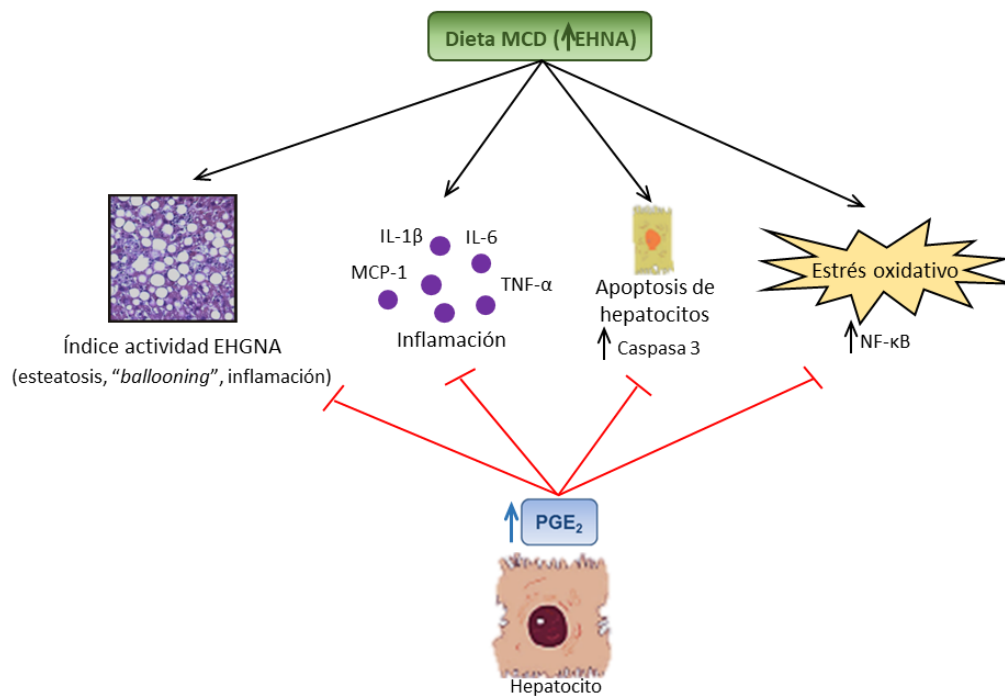


Figura 36. La síntesis de PGE_2 en los hepatocitos protege frente a la EHNA inducida por una dieta MCD. En presencia de PGE_2 , los hepatocitos se encuentran protegidos frente a la inflamación, esteatosis, “ballooning”, apoptosis y estrés oxidativo inducidos por una dieta MCD. Como consecuencia, se impide la progresión de la EHNA.

Teniendo en cuenta la importancia de la apoptosis de los hepatocitos durante el desarrollo de la EHNA, se decidió analizar con más profundidad el mecanismo por el cual COX-2 presenta un efecto anti-apoptótico *in vivo*. Se ha observado que la vía de señalización de TGF- β 1 juega un papel importante en la muerte celular de los hepatocitos, siendo un potente inductor de su apoptosis a través del aumento del estrés oxidativo (64, 140). Así se demuestra en un estudio reciente (168) que indica que la señalización por TGF- β 1 en los hepatocitos contribuye al desarrollo de la EHNA, mediante un aumento de la activación de Smad y la producción de ERO. En el presente trabajo se confirma esta función pro-apoptótica y oxidativa de TGF- β 1 en los hepatocitos procedentes de los ratones Wt. También se ha observado que PGE_2 ejerce un papel protector frente a la acción de TGF- β 1, lo que concuerda con otros estudios sobre la acción de diversas prostaglandinas en los hepatocitos (77, 85). Los niveles de expresión de los genes anti-oxidantes analizados (*Cat*, *Sod1*, *Sod2* y *Gsr*) aumentan en los hepatocitos de los ratones

hCOX-2-Tg tratados con TGF- β 1, pero no en los de los ratones Wt, indicando que la producción constitutiva de PGE₂ aumenta los niveles de los genes anti-oxidantes como un mecanismo de defensa frente al daño causado por la presencia de TGF- β 1 en el hepatocito. El uso del inhibidor de COX-2, DFU, revirtió el aumento de la expresión de estos genes en los hepatocitos de los ratones hCOX-2-Tg, con el consiguiente incremento de los niveles de peroxinitritos y de la apoptosis. Estos resultados, sumados a los datos obtenidos respecto al papel anti-oxidante de COX-2 en otros trabajos (2, 26), apoyan la función protectora de PGE₂ en el hepatocito.

La fibrosis hepática ocurre como un proceso de cicatrización en respuesta al daño hepático subyacente a enfermedades crónicas del hígado, producidas por diversos factores como el consumo excesivo de alcohol, la infección por el virus de la hepatitis, la esteatosis o la resistencia a la insulina. El proceso se inicia con una respuesta inflamatoria, e implica alteraciones en la composición y cantidad de la matriz extracelular. Sin embargo, si la lesión prevalece, se produce la fibrosis, con una acumulación excesiva de fibras de colágeno y otros componentes de la MEC en el parénquima hepático. Las HSC son las principales células responsables de la fibrosis hepática, ya que, tras su activación, se convierten en las productoras mayoritarias de MEC (24, 147).

Para analizar el papel de COX-2 en la fibrosis hepática, se ha utilizado un modelo murino de tratamiento con CCl₄, capaz de reflejar las características más importantes de la fibrosis hepática en humanos (incluyendo inflamación, regeneración, acumulación de fibras, etc.). Como apoyo a los resultados obtenidos con este modelo, también se ha utilizado un modelo colestático de daño hepático, BDL. Ambos modelos son de los más utilizados para los estudios sobre la fibrosis hepática (94). En los resultados obtenidos *in vivo* se ha observado que la expresión de COX-2 en el hepatocito disminuye la progresión de la fibrosis. Esto lo hace a través de la inhibición de la vía de señalización de TGF- β 1, disminuyendo la activación de SMAD; e impidiendo la activación de las HSC. Algo similar se observa en los animales hCOX-2-Tg sometidos a BDL. A pesar de las controversias existentes respecto al papel de COX-2, este efecto anti-fibrótico no solo se confirma en otros estudios sobre fibrosis hepática, sino también en trabajos sobre fibrosis pulmonar o renal (5, 9, 68, 74, 154). En relación con esto, se ha observado que la disminución de la expresión de marcadores pro-fibróticos como PDGF-B y su receptor, además de la inducción del factor anti-fibrótico HGF en los ratones hCOX-2-Tg tratados con CCl₄, participan en la mediación del efecto beneficioso de las prostaglandinas (8,

165). La prevención de la activación de las HSC por parte de COX-2, no se ha observado solamente *in vivo*. En un trabajo reciente, se determinó mediante un análisis de expresión por *microarrays*, que la expresión del 55,4% de los genes alterados por la acción de TGF- β 1 en la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, fue revertida por un tratamiento con PGE₂ (160). De forma similar, en el presente trabajo, tanto en las líneas celulares utilizadas (LX-2 y HSC primarias) como al imitar las condiciones del modelo *in vivo* incubando las HSC con el medio condicionado de los hepatocitos, se ha confirmado que el tratamiento *in vitro* con PGE₂ contrarresta la inducción de la activación de las HSC, producida tanto por el tratamiento con TGF- β 1 como por el tratamiento con CCl₄. Estos resultados indican que PGE₂ ejerce un papel anti-fibrótico, y ponen de manifiesto la importancia de la expresión de COX-2 en el hepatocito sobre la inhibición de la fibrosis hepática, dada su acción frente a la activación de las HSC.

En base a los resultados obtenidos, se analizó el mecanismo por el que PGE₂ es capaz de disminuir la activación de las HSC y por tanto, la producción de MEC. Tras el uso de diferentes inhibidores farmacológicos en las células LX-2, se observó que el proceso de regulación es sumamente complejo, pues están implicadas diversas vías de señalización (PKC, PKA, p38, MEK/ERK y NF- κ B), además de los receptores EP2 y EP4, a través de los cuales PGE₂ ejerce su efecto anti-fibrótico. En conformidad con estos resultados, estudios previos indican que PGE₂ inhibe la expresión de α -SMA y colágeno, así como la proliferación y la diferenciación de fibroblastos pulmonares (10, 57) a través de la vía de señalización EP2 o EP4/AMPC/PKA. Asimismo, esta vía está involucrada tanto en la disminución de la proliferación estimulada por PDGF en las HSC (82), como en la supresión de la proliferación y la fibrosis en células esteladas pancreáticas humanas (127). Por otro lado, se conoce que la vía de señalización de p38 participa en la inducción de α -SMA mediada por TGF- β 1 en los fibroblastos pulmonares, y que la acción protectora de PGE₂ implica la inhibición de esta vía a través de EP2/AMPC/PKA (126). También se ha demostrado que, en fibroblastos pulmonares y renales, PGE₂ inhibe la estimulación del CTGF inducida por TGF- β 1, a través de la inhibición de las vías de p38, ERK y JNK (7). Sin embargo, en un estudio sobre la función cardíaca (98), PGE₂ es capaz de disminuir la hipertrofia y la fibrosis a través de su receptor EP3, cuya acción se encuentra mediada en parte por la vía de señalización de ERK. Estos ejemplos refuerzan la idea sobre la complejidad de la regulación de este proceso, no solo porque se vean implicados diferentes receptores y vías de señalización, sino porque dependiendo del tipo

celular utilizado (LX-2 en este caso), el mecanismo que media la acción anti-fibrótica de PGE₂ parece ser diferente.

Los miARNs juegan un papel esencial en numerosos procesos biológicos, tales como el crecimiento celular, diferenciación, apoptosis, inflamación, etc.; y en enfermedades como cáncer, diabetes, asma o enfermedades cardiovasculares entre otras. Es de relevancia su papel en las enfermedades hepáticas, ya que se han observado alteraciones en los niveles de expresión de los miARNs en pacientes con EHGNA, fibrosis, cirrosis y CHC, e incluso en procesos como la proliferación de los hepatocitos durante la regeneración hepática (28, 43, 130, 132). En un trabajo previo del grupo se observó que COX-2 es capaz de regular el procesamiento de diversos miARNs implicados en la señalización de la insulina en el hígado. En concreto, COX-2 disminuye los niveles de miR-183 en las células hepáticas incrementando los niveles de la helicasa p68 (DDX5) vía PI3K/p300. Esto promueve protección frente a la RI, incrementando los niveles de IRS1 (113). Teniendo en cuenta estos resultados, y para conocer en mayor profundidad el mecanismo mediante el cual PGE₂ protege frente a la fibrosis hepática, se ha analizado la implicación de los miARNs y su relación con PGE₂ dependiente de COX-2 en esta enfermedad.

Tras realizar el análisis de expresión mediante un *microarray*, los miARNs elegidos fueron miR-23a-5p, miR-28a-5p, miR-199a-3p y miR-29a-3p. Se escogieron miR-199a-3p y miR-29a-3p como controles pro-fibróticos o anti-fibróticos, respectivamente, y a miR-23a-5p y miR-28a-5p porque fueron los más estadísticamente significativos en los datos del análisis. Además, para esta elección, se optó por comparar los resultados obtenidos en las HSC de los ratones hCOX-2-Tg frente a los Wt en la condición de CCl₄, debido a que este es el compuesto que induce la fibrosis en este modelo. En estudios previos, se ha observado que la regulación de los miARNs es muy variable, siendo específica de cada tipo celular o de cada órgano o tejido, y además puede variar dependiendo de cada patología. En el contexto del hígado se cumple esta premisa, ya que los miARNs se expresan y se regulan de forma selectiva en cada tipo celular (129, 130, 132). Esto se ha confirmado en el caso de miR-23a-5p y miR-28a-5p: los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que su regulación es opuesta en las HSC al compararla con los hepatocitos. Por otro lado, se eligieron miR-199a-3p y miR-29a-3p como controles en la validación del *array* debido a que su participación en la fibrosis hepática ya se había estudiado previamente. La sobreexpresión de miR-199a en las HSC se correlaciona con la progresión del daño hepático y el aumento de la fibrosis hepática y

la cirrosis, ya que su acción afecta a la inducción de la expresión de diversos genes relacionados con la fibrosis (TIMP1, procolágeno α -1, MMP13) en estas células (114). En este sentido, se ha observado que la acción beneficiosa de la curcumina (compuesto con propiedades anti-inflamatorias, anti-oxidantes y anti-cancerígenas que se ha visto que reduce la severidad de la EHNA (87)) disminuye su expresión tras un tratamiento con CCl₄ (62). Se considera a miR-199a, junto a la familia de miR-200, como los principales miARNs asociados a la regulación de la fibrosis hepática (62, 114). Su acción pro-fibrótica no solo se pone de manifiesto en modelos animales tratados con CCl₄, o en modelos *in vitro* de HSC tratadas con TGF- β 1, sino también en el hígado de pacientes con fibrosis, o hepatitis C crónica (132). Por el contrario, se ha observado que todos los miembros de la familia de miR-29 presentan un papel anti-fibrótico, ya que su sobreexpresión en las HSC se asocia a una disminución de la producción de colágeno (130), que puede estar mediada por la acción de HGF (86). También se ha observado que en un modelo de fibrosis inducida por CCl₄, miR-29b es capaz de disminuir la activación de las HSC y aumentar su apoptosis inhibiendo la vía de PI3K/AKT (159). Además, la activación de las HSC, ya sea por CCl₄, BDL o TGF- β 1, inhibe la expresión de miR-29a, y esto se asocia a un aumento de la producción de matriz extracelular. Esta disminución de los miembros de la familia de miR-29 se ha relacionado con procesos de inflamación hepática crónica y fibrogénesis, tanto en diferentes modelos de fibrosis hepática en ratón, como en otras muchas especies, incluyendo pacientes con fibrosis hepática (130, 132). Por ejemplo, se ha observado que un tratamiento con TGF- β 1 en hepatocitos humanos reduce la expresión de miR-29a/b/c, de forma similar a lo observado en ratones tratados con CCl₄ (81). Los resultados del presente trabajo se corresponden con estos estudios, indicando que la expresión de COX-2 en el hepatocito participa en la regulación de estos miARN en las HSC, disminuyendo la expresión de miR-199a-3p y aumentando la de miR-29a-3p. En relación con los otros dos miARN escogidos, miR-23a-5p y miR-28a-5p, su papel en la fibrosis hepática todavía no se ha esclarecido. En algunos trabajos se ha observado que la expresión de miR-23a-5p aumenta en pacientes con EHGNA (32, 43). Además, la señalización por TGF- β 1 y Smad 2/3 induce su expresión, participando en la TEM de las enfermedades intersticiales pulmonares, favoreciendo la proliferación de los fibroblastos pulmonares (33). También se ha visto su implicación en el desarrollo de la TEM en el sobrecrecimiento gingival, enfermedad fibrótica donde se da una acumulación de matriz extracelular en el tejido conectivo gingival (166). Respecto a miR-

28, por un lado, se ha observado que sus niveles aumentan en el plasma de los pacientes con embolia pulmonar (172), mientras que, por otra parte, su papel beneficioso en el carcinoma hepatocelular parece bastante asentado (139, 171). Sin embargo, apenas hay información sobre su implicación en la fibrosis. Esta falta de información sobre su participación en la fibrosis hepática, sumada al hecho de que en los datos del análisis estos dos miARNs presentaban una diferencia más significativa, es la razón de que se hayan elegido como objeto de este estudio.

Tras el análisis de la expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p en las HSC, los resultados indican que la expresión constitutiva de COX-2 disminuye los niveles de estos miARNs en el modelo de fibrosis hepática inducida con CCl₄. Dado el papel protector de COX-2 en la fibrosis y lo observado con miR-199a-3p, los datos indican que estos miARNs presentan una función pro-fibrótica. Esto se confirmó en el modelo de BDL y en los diferentes modelos *in vitro* utilizados, donde el aumento de la expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p inducido por TGF- β 1 se revierte tras añadir PGE₂; y su sobreexpresión genera un aumento de la expresión de α -SMA y COL1A1. Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con estudios previos que muestran que PGE₂ tiene un efecto opuesto a TGF- β 1, revirtiendo la diferenciación de fibroblastos pulmonares o la activación de HSC (57, 67, 73). Para profundizar en el mecanismo por el cual PGE₂ ejerce este efecto protector frente a la fibrosis hepática, se analizó la implicación de la vía de señalización de TGF- β 1, utilizando un inhibidor del receptor de TGF- β 1 (T β R-I, LY364947). Los resultados muestran que, tras el tratamiento con el inhibidor, PGE₂ no es capaz de revertir el aumento observado en la expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p producido por TGF- β 1, indicando que PGE₂ regula la expresión de estos miARNs, al menos en parte, a través de la vía de señalización de TGF- β 1.

Tras confirmar que la expresión de los miARNs elegidos está regulada por PGE₂ en las HSC, se analizaron sus genes diana, para determinar las vías de señalización que se encuentran enriquecidas por la presencia de COX-2. El análisis se centró en las vías relacionadas con la apoptosis y la señalización de TGF- β 1, teniendo en cuenta los resultados previos obtenidos sobre la función protectora de COX-2 en la EHNA y la fibrosis hepática. Como resultado, se observó que los niveles de expresión de los genes *Erk1*, *Bmp2*, *Cav1* y *Cdh1* se encuentran aumentados de forma significativa en las HSC en presencia de PGE₂, tanto en el modelo *in vivo* como en el *in vitro*, y de igual forma se observa un aumento en los niveles de proteína. Además, la sobreexpresión de miR-23a-

5p y miR-28a-5p inhibe la expresión de estos genes. Este hallazgo apoya la hipótesis sobre el papel pro-fibrótico de miR-23a-5p y miR-28a-5p en las HSC, ya que estos genes diana presentan funciones anti-fibróticas y pro-apoptóticas. Respecto a ERK, en la revisión de Cagnol & Chambard (17) se aporta un resumen sobre las funciones anti-proliferativas y pro-apoptóticas de esta vía de señalización en una gran variedad de modelos celulares. Por ejemplo, en fibroblastos murinos L929, se indica que la apoptosis inducida por el estrés oxidativo (en concreto H₂O₂) está mediada por la fosforilación de ERK1/2, pues su inhibición bloquea el proceso apoptótico (89). Además, al cultivar fibroblastos pulmonares en presencia de matriz extracelular derivada de los mismos, se ha observado una disminución de la expresión de Col1a2 a través de la vía de Ras/MEK/ERK, teniendo el factor de transcripción Sp1 un papel directo en esta inhibición (39). Los BMPs son miembros de la superfamilia de TGF- β 1 y presentan función anti-fibrótica en muchos órganos, como riñón, hígado o pulmón. Por ejemplo, BMP2 antagoniza la actividad pro-fibrótica de TGF- β 1 inhibiendo α -SMA y COL1A1 a través de Smad1 en las células esteladas pancreáticas (54). Las funciones pro-apoptóticas de BMP2 también se han observado en las células MH60 (hibridoma de ratón), donde incrementa la apoptosis a través de la activación de TAK1 y la fosforilación de p38 (79). En cuanto a CAV-1, es un potente regulador negativo de la señalización por TGF- β 1, y su acción se ve inhibida por miR-199a-5p, lo que concuerda con los datos conocidos sobre la acción pro-fibrótica de este miARN (96). Por otro lado, CAV-1 también es capaz de prevenir la formación de colágeno inducida por PAR2 en las HHStecs (una línea de HSC humanas), a la vez que aumenta la apoptosis en estas células (92). Finalmente, la disminución de la expresión de CDH-1/E-cadherina, con el consiguiente incremento de la expresión de N-cadherina, según progresa la activación de las HSC, también contribuye a remarcar sus propiedades anti-fibróticas (95). Además, la expresión de E-cadherina promueve la apoptosis en las HSC tras un tratamiento con icatirina, similar a la inhibición de la proliferación que este compuesto provoca en las LX-2 y HSC-T6 (91, 146).

Teniendo en cuenta la implicación de los miARNs estudiados en la apoptosis, se decidió analizar el papel que ejerce PGE₂ en la apoptosis y la proliferación de las HSC. Los resultados obtenidos indican que PGE₂ tiene una acción pro-apoptótica y anti-proliferativa sobre las HSC, a diferencia de lo observado en los hepatocitos, donde PGE₂ presenta un papel claramente anti-apoptótico. La apoptosis de los hepatocitos es una característica de las enfermedades hepáticas crónicas y se asocia no solo con EHNA, sino también con el desarrollo de la fibrosis. Tras la exposición al daño, los hepatocitos sufren

apoptosis. Como consecuencia, las HSC migran a la zona donde se ha producido este daño hepático para engullir los cuerpos apoptóticos de los hepatocitos, lo que promueve su activación a miofibroblastos hepáticos y el desarrollo de la fibrosis, aumentando la deposición de MEC y la formación de cicatrices en el hígado. Pero también existen muchas evidencias que indican que la apoptosis de las HSC es el principal mecanismo asociado a la resolución de la fibrosis, ya que causaría una disminución en el número de HSC activadas (24). Estos datos refuerzan la hipótesis sobre el papel anti-fibrótico de PGE_2 a través de la inhibición de miR-23a-5p y miR-28a-5p, dada su función anti-apoptótica en los hepatocitos y pro-apoptótica en las HSC. El aumento de la proliferación y la disminución de la apoptosis causados por la sobreexpresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p en las HSC contribuye a reforzar esta idea, ya que contrarresta el efecto de PGE_2 . En resumen, los resultados obtenidos indican que la expresión de COX-2 en el hepatocito atenúa la fibrosis hepática a través de la producción de PGE_2 , que ejerce su acción de dos formas distintas: inhibiendo la apoptosis de los hepatocitos, lo que reduciría la activación de las HSC; y disminuyendo la expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p en las HSC, lo que reduce la proliferación y aumenta la apoptosis en estas células, impidiendo la progresión de la fibrosis (Figura 37).

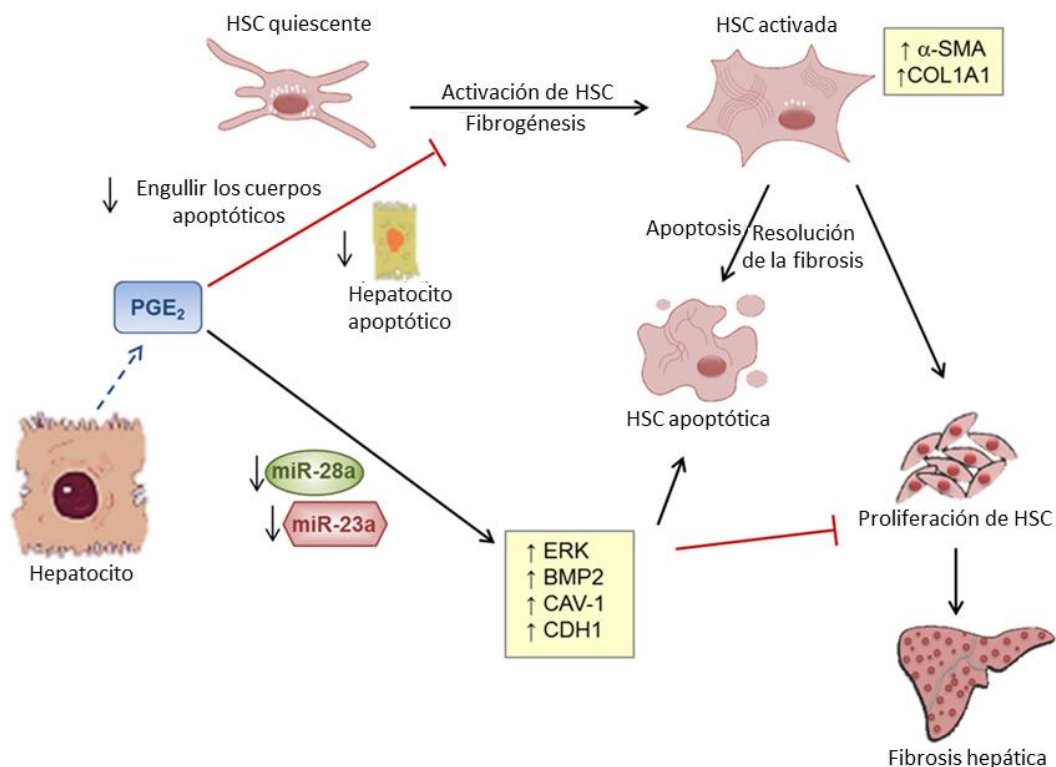


Figura 37. La síntesis de PGE_2 en los hepatocitos protege frente a la fibrosis hepática. En presencia de PGE_2 , los hepatocitos se encuentran protegidos frente a la apoptosis. De esta forma,

las HSC no pueden engullir el cuerpo apoptótico del hepatocito, lo que disminuye su activación. Además, PGE₂ disminuye la expresión de miR-23a y miR-28a en las HSC. Esto provoca un incremento de la expresión de ERK, BMP2, CAV1 y CDH1, lo que conduce a un aumento de la apoptosis y a una inhibición de la proliferación de las HSC. Como consecuencia, se observa una disminución de la expresión de α -SMA y COL1A1 en las HSC.

Trabajos previos demuestran que la expresión de COX-2 y PGE₂ se induce en pacientes con EHNA, hepatitis B o C, cirrosis hepática o CHC (29, 58, 99, 116). En el presente trabajo, también se ha observado un aumento progresivo de los niveles hepáticos de COX-2 y los niveles en suero de PGE₂ en los pacientes con EHGNA (ENA y EHNA) y fibrosis. Estos resultados se podrían interpretar asumiendo que COX-2 y PGE₂ participan en el desarrollo de estas patologías, lo que puede resultar contradictorio si se compara con su función protectora observada en los modelos animales. En el trabajo de García-Alonso *et al.* (55) observaron un aumento de PGE₂ endógena en el tejido adiposo blanco de pacientes obesos. Sin embargo, tras tratar estos tejidos con PGE₂ exógena, obtuvieron una disminución en la expresión de los genes relacionados con el desarrollo de la inflamación y la fibrosis. Además, al tratar adipocitos 3T3 diferenciados expuestos a TGF- β con PGE₂, observaron un efecto protector similar. Esto indica que la inducción de la expresión de COX-2 endógena a lo largo del desarrollo de la EHNA y la fibrosis forma parte de un mecanismo de defensa en respuesta al daño hepático. También se dan ejemplos similares en modelos animales. En este sentido, se ha determinado que el palmitato aumenta la expresión de COX-2 en células murinas del músculo esquelético. Sin embargo, tras analizar la contribución de COX-2 al desarrollo de la inflamación inducida por palmitato, se corroboró su efecto protector, ya que al inhibir la expresión de COX-2 se promueve la inflamación, hecho que se previene con la adición de PGE₂ exógena (35). El aumento de COX-2 por la acción de TGF- β 1 es bien conocido (67, 73), al igual que el efecto inhibitorio de PGE₂ exógena sobre la activación de las HSC humanas y murinas, inducida por TGF- β 1 (67). Además, se sabe que en modelos murinos de intoxicación por paracetamol (APAP), en los cuales se incrementa de forma significativa la producción de PGE₂ endógena, al añadir PGE₂ exógena antes o después del tratamiento con APAP, se consigue un efecto hepatoprotector muy pronunciado (21). A este respecto, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que los niveles hepáticos de COX-2 y PGE₂ también tienden a incrementarse en los animales tratados con una dieta MCD. En base a todos estos datos, se propone que los niveles elevados de PGE₂ endógena asociados con la progresión de la EHGNA o fibrosis ejercen un papel protector frente a

la enfermedad y contribuyen a su resolución. Sin embargo, el nivel de la inducción de COX-2 asociada a la progresión de estas patologías no alcanza a revertir el daño de la misma forma que se observa al añadir PGE₂ de forma exógena o con una expresión constitutiva de la enzima (como en los ratones hCOX-2-Tg). Respecto a lo observado en los niveles de expresión de los miARNs en el suero de los pacientes con fibrosis, la expresión de miR-28-5p se correlaciona negativamente con el aumento de PGE₂. Esto indica que la regulación de este miARN en los pacientes fibróticos se da de forma similar a la observada en los modelos murinos de fibrosis hepática. En este sentido, y como parte de su papel hepatoprotector, PGE₂ regularía negativamente los niveles de miR-28-5p en los pacientes, a medida que progresa la enfermedad. Este papel de PGE₂ resulta ser menos evidente en el caso de miR-23a-5p. Los datos obtenidos sugieren que, a pesar de que PGE₂ endógena derivada de la inducción de COX-2 inhiba la expresión de miR-28-5p, e impida la inducción de miR-23a-5p, sus efectos no son suficientes para impedir la progresión de la fibrosis en estos pacientes. A diferencia del modelo murino de expresión constitutiva de COX-2, donde los efectos protectores producidos por la síntesis prolongada de PGE₂ se asemejan más a un tratamiento con PGE₂ exógena.

No existe una terapia efectiva frente a la EHNA y la fibrosis hepática. Las estrategias farmacológicas utilizadas son limitadas, por lo que es necesario desarrollar terapias más específicas. La aproximación más efectiva sería el resultado de la combinación de tratamientos farmacológicos unidos a un cambio del estilo de vida (38). Entre las terapias estudiadas se incluyen la actuación sobre factores de transcripción, lipotoxicidad, modificaciones químicas de citoquinas, inhibidores de caspasas e inflamación, e incluso utilización de nanopartículas o estrategias basadas en el uso de miARNs (115, 136, 137). Los tratamientos basados en el uso de AINEs también son comúnmente utilizados. Sin embargo, los efectos adversos de estos inhibidores de COX son frecuentes, pudiendo incrementar el riesgo de sangrado gastrointestinal en pacientes cirróticos (88) o aumentando la incidencia de sufrir problemas cardiovasculares, sobre todo tras un tratamiento a largo plazo (156). También se ha observado su participación en la hepatotoxicidad, aunque la toxicidad derivada de los inhibidores selectivos para COX-2 es menor que la observada en los anti-inflamatorios no selectivos. Además, son capaces de afectar a la expresión de otros genes a través de vías independientes de COX-2 (6). Teniendo en cuenta la controversia derivada del uso de inhibidores de COX-2 (68, 78, 122) y dado el papel protector de PGE₂ observado en el presente trabajo, sería recomendable plantear terapias alternativas al uso de estos inhibidores, sean selectivos o

no para COX-2. Una posible aproximación, para potenciar el efecto de la prostaglandina endógena, consistiría en el uso de prostaglandinas o análogos estables de las mismas (como la 16,16dmPGE₂ (101)), o en potenciar la señalización de COX-2 en el hígado de forma similar a lo que ocurre en los ratones hCOX-2-Tg. Las terapias dirigidas a miARNs también serían beneficiosas, dada la relación de miR-23a-5p y miR-28a-5p con la activación de las HSC. Para ello, sería necesario un estudio más detallado, analizando potenciales dianas farmacológicas de estos miARNs, para desarrollar incluso estrategias terapéuticas personalizadas.

6. Conclusiones

- La expresión constitutiva de COX-2 en el hepatocito protege a los ratones frente a la EHNA inducida por una dieta MCD, dado su papel anti-inflamatorio, anti-apoptótico y anti-oxidante.
- Los ratones transgénicos que expresan COX-2 en el hepatocito están protegidos frente a la fibrosis hepática inducida por CCl₄ y BDL, mediante la inhibición de la activación de las HSC tanto *in vivo* como *in vitro*.
- PGE₂ derivada de la expresión constitutiva de COX-2 en el hepatocito inhibe la expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p en las HSC en un modelo de fibrosis hepática *in vivo* inducida por CCl₄ o BDL, y en un modelo *in vitro* inducido por TGF-β1.
- miR-23a-5p y miR-28a-5p participan en la regulación de la fibrosis hepática modulando la expresión de los genes diana *Erk1*, *Bmp2*, *Cav1* y *Cdh1*, con funciones anti-fibróticas y pro-apoptóticas.
- PGE₂ atenúa la fibrosis hepática por dos mecanismos: inhibiendo la apoptosis de los hepatocitos y disminuyendo la expresión de miR-23a-5p y miR-28a-5p en las HSC, lo que reduce la proliferación y aumenta la apoptosis en estas células.
- La inducción de la expresión de COX-2 y PGE₂ endógena en pacientes con EHNA y fibrosis forma parte de un mecanismo de defensa en respuesta al daño hepático.

7. Bibliografía

1. Agra Andrieu, N., Motiño, O., Mayoral, R., Llorente Izquierdo, C., Fernández-Alvarez, A., Boscá, L., Casado, M., & Martín-Sanz, P. (2012). Cyclooxygenase-2 Is a Target of MicroRNA-16 in Human Hepatoma Cells. *PLoS ONE*, **7**(11): e50935.
2. Andrade Jr, D. R., Andrade, D. R., & dos Santos, S. A. (2009). Study of rat hepatocytes in primary culture submitted to hipoxia and reoxygenation: action of the cytoprotectors prostaglandin E₁, superoxide dismutase, allopurinol and verapamil. *Arquivos de Gastroenterologia*, **46**(4), 333–340.
3. Baeck, C., Wehr, A., Karlmark, K. R., Heymann, F., Vucur, M., Gassler, N., Huss, S., Klussmann, S., Eulberg, D., Luedde, T., Trautwein, C., & Tacke, F. (2012). Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut*, **61**(3), 416–426.
4. Benedict, M., & Zhang, X. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World Journal of Hepatology*, **9**(16), 715–732.
5. Beno, D. W. A., Espinal, R., Edelstein, B. M., & Davis, B. H. (1993). Administration of prostaglandin E₁ analog reduces rat hepatic and ito cell collagen gene expression and collagen accumulation after bile duct ligation injury. *Hepatology*, **17**(4), 707–714.
6. Bessone, F., Hernandez, N., Roma, M. G., Ridruejo, E., Mendizabal, M., Medina-Cáliz, I., Robles-Díaz, M., Lucena, M. I., & Andrade, R. J. (2016). Hepatotoxicity induced by coxibs: how concerned should we be? *Expert Opinion on Drug Safety*, **15**(11), 1463–1475.
7. Black, S. A., Palamakumbura, A. H., Stan, M., & Trackman, P. C. (2007). Tissue-specific mechanisms for CCN2/CTGF persistence in fibrotic gingiva: Interactions between cAMP and MAPK signaling pathways, and prostaglandin E₂-EP3 receptor mediated activation of the c-Jun N-terminal kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **282**(21), 15416–15429.

8. Bonner, J. C. (2004). Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, **15**(4), 255–273.
9. Bonner, J. C., Rice, A. B., Ingram, J. L., Moomaw, C. R., Nyska, A., Bradbury, A., Sessoms, A. R., Chulada, P. C., Morgan, D. L., Zeldin, D. C., & Langenbach, R. (2002). Susceptibility of cyclooxygenase-2-deficient mice to pulmonary fibrogenesis. *The American Journal of Pathology*, **161**(2), 459–470.
10. Bozyk, P. D., & Moore, B. B. (2011). Prostaglandin E₂ and the Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **45**(3), 445–452.
11. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**(1–2), 248–254.
12. Braet, F., Taatjes, D. J., & Wisse, E. (2017). Probing the unseen structure and function of liver cells through atomic force microscopy. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, July 6, 2017: 10.1016/j.semcdb.2017.07.001.
13. Brenner, C., Galluzzi, L., Kepp, O., & Kroemer, G. (2013). Decoding cell death signals in liver inflammation. *Journal of Hepatology*, **59**(3), 583–594.
14. Brenner, D. A. (2009). Molecular pathogenesis of liver fibrosis. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, **120**, 361–368.
15. Breyer, R. M., Bagdassarian, C. K., Myers, S. A., & Breyer, M. D. (2001). Prostanoid receptors: Subtypes and Signaling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **41**, 661–690.
16. Byrne, C. D. (2010). Fatty liver: Role of inflammation and fatty acid nutrition. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **82**(4–6), 265–271.

17. Cagnol, S., & Chambard, J. C. (2010). ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death - Apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS Journal*, **277**, 2–21.
18. Callejas, N. A., Bosca, L., Williams, C. S., DuBois, R. N., & Martin-Sanz, P. (2000). Regulation of cyclooxygenase 2 expression in hepatocytes by CCAAT/enhancer-binding proteins. *Gastroenterology*, **119**(2), 493–501.
19. Casado, M., Callejas, N. A., Rodrigo, J., Zhao, X., Dey, S. K., Bosca, L., & Martin-Sanz, P. (2001). Contribution of cyclooxygenase 2 to liver regeneration after partial hepatectomy. *Faseb Journal*, **15**(11), 2016–2018.
20. Casado, M., Mollá, B., Roy, R., Fernández-Martínez, A., Cucarella, C., Mayoral, R., Bosca, L., & Martín-Sanz, P. (2007). Protection against Fas-induced liver apoptosis in transgenic mice expressing cyclooxygenase 2 in hepatocytes. *Hepatology*, **45**(3), 631–638.
21. Cavar, I., Kelava, T., Vukojevic, K., Saraga-Babic, M., & Culo, F. (2010). The role of prostaglandin E₂ in acute acetaminophen hepatotoxicity in mice. *Histology and Histopathology*, **25**(7), 819–830.
22. Cazanave, S. C., & Gores, G. J. (2010). Mechanisms and clinical implications of hepatocyte lipapoptosis. *Journal of Clinical Lipidology*, **5**(1), 71–85.
23. Chakrabarty, A., Tranguch, S., Daikoku, T., Jensen, K., Furneaux, H., & Dey, S. K. (2007). MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, **104**(38), 15144–15149.
24. Chakraborty, J. B., Oakley, F., & Walsh, M. J. (2012). Mechanisms and biomarkers of apoptosis in liver disease and fibrosis. *International Journal of Hepatology*, **2012**, 648915.
25. Chen, H., Cai, W., Chu, E. S. H., Tang, J., Wong, C.-C., Wong, S. H., Sun, W., Liang, Q., Fang, J., Sun, Z., & Yu, J. (2017). Hepatic cyclooxygenase-2 overexpression

- induced spontaneous hepatocellular carcinoma formation in mice. *Oncogene*, **36**(31), 4415–4426.
26. Chen, K., Li, J., Li, S., Feng, J., Liu, T., Wang, F., Dai, W., Xia, Y., Lu, J., Zhou, Y., & Guo, C. (2017). 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ alleviates hepatic ischemia-reperfusion injury in mice via inducing antioxidant response and inhibiting apoptosis and autophagy. *Acta Pharmacologica Sinica*, (II), 1–16.
27. Chen, L., Wang, X., Wang, H., Li, Y., Yan, W., Han, L., Zhang, K., Zhang, J., Wang, Y., Feng, Y., Pu, P., Jiang, T., Kang, C., & Jiang, C. (2012). MiR-137 is frequently down-regulated in glioblastoma and is a negative regulator of Cox-2. *European Journal of Cancer*, **48**(16), 3104–3111.
28. Chen, X., Zhao, Y., Wang, F., Bei, Y., Xiao, J., & Yang, C. (2015). MicroRNAs in Liver Regeneration. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **37**, 615-628.
29. Cheng, A. S., Chan, H. L., Leung, W. K., To, K. F., Go, M. Y., Chan, J. Y., Liew, C. T., & Sung, J. J. (2004). Expression of HBx and COX-2 in chronic hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma: implication of HBx in upregulation of COX-2. *Modern Pathology*, **17**(10), 1169–1179.
30. Cheng, Q., Li, N., Chen, M., Zheng, J., Qian, Z., Wang, X., Huang, C., Xu, S., & Shi, G. (2013). Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular apoptosis by interacting with TNF- α and IL-6 in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, **58**(10), 2895–2902.
31. Cheng, Y., Li, Y., Liu, D., Zhang, R., & Zhang, J. (2014). MiR-137 effects on gastric carcinogenesis are mediated by targeting Cox-2-activated PI3K/AKT signaling pathway. *FEBS Letters*, **588**(17), 3274–3281.
32. Cheung, O., Puri, P., Eicken, C., Contos, M. J., Mirshahi, F., Maher, J. W., Kellum, J. M., Min, H., Luketic, V. A., & Sanyal, A. J. (2008). Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic microRNA expression. *Hepatology*, **48**(6), 1810–1820.

33. Cho, J.-H., Gelinas, R., Wang, K., Etheridge, A., Piper, M. G., Batte, K., Dakhallah, D., Price, J., Bornman, D., Zhang, S., Marsh, C., & Galas, D. (2011). Systems biology of interstitial lung diseases: integration of mRNA and microRNA expression changes. *BMC Medical Genomics*, **4**, 8.
34. Cohen, J. C., Horton, J. D., & Hobbs, H. H. (2011). Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. *Science*, **332**(6037), 1519–1523.
35. Coll, T., Palomer, X., Blanco-Vaca, F., Escolà-Gil, J. C., Sánchez, R. M., Laguna, J. C., & Vázquez-Carrera, M. (2010). Cyclooxygenase 2 inhibition exacerbates palmitate-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells. *Endocrinology*, **151**(2), 537–548.
36. Daikoku, T., Hirota, Y., Tranguch, S., Joshi, A. R., DeMayo, F. J., Lydon, J. P., Ellenson, L. H., & Dey, S. K. (2008). Conditional loss of uterine Pten unfaithfully and rapidly induces endometrial cancer in mice. *Cancer Research*, **68**(14), 5619–5627.
37. Day, C. P. (2011). Non-alcoholic fatty liver disease: a massive problem. *Clinical Medicine (London, England)*, **11**(2), 176–178.
38. Dowman, J. K., Armstrong, M. J., Tomlinson, J. W., & Newsome, P. N. (2011). Current therapeutic strategies in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **13**(8), 692–702.
39. Dzobo, K., Leaner, V. D., & Parker, M. I. (2012). Feedback regulation of the $\alpha 2(1)$ collagen gene via the Mek-Erk signaling pathway. *IUBMB Life*, **64**(1), 87–98.
40. Fernández-Alvarez, A., Llorente-Izquierdo, C., Mayoral, R., Agra, N., Boscá, L., Casado, M., & Martín-Sanz, P. (2012). Evaluation of epigenetic modulation of cyclooxygenase-2 as a prognostic marker for hepatocellular carcinoma. *Oncogenesis*, **1**(7), e23.
41. Fernández-Martínez, A., Callejas, N. A., Casado, M., Boscá, L., & Martín-Sanz, P. (2004). Thioacetamide-induced liver regeneration involves the expression of

- cyclooxygenase 2 and nitric oxide synthase 2 in hepatocytes. *Journal of Hepatology*, **40**(6), 963–970.
42. Fernández-Martínez, A., Mollá, B., Mayoral, R., Boscá, L., Casado, M., & Martín-Sanz, P. (2006). Cyclo-oxygenase 2 expression impairs serum-withdrawal-induced apoptosis in liver cells. *Biochemical Journal*, **398**(3), 371–380.
43. Ferreira, D. M. S., Simão, A. L., Rodrigues, C. M. P., & Castro, R. E. (2014). Revisiting the metabolic syndrome and paving the way for microRNAs in non-alcoholic fatty liver disease. *The FEBS Journal*, **281**, 2503–2524.
44. FitzGerald, G. A. (2003). COX-2 and beyond: approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2**(11), 879–890.
45. Francés, D. E., Ingaramo, P. I., Mayoral, R., Través, P., Casado, M., Valverde, Á. M., Martín-Sanz, P. & Carnovale, C. E. (2013). Cyclooxygenase-2 over-expression inhibits liver apoptosis induced by hyperglycemia. *Journal of Cellular Biochemistry*, **114**(3), 669–680.
46. Francés, D. E., Motiño, O., Agrá, N., González-Rodríguez, Á., Fernández-Álvarez, A., Cucarella, C., Mayoral, R., Castro-Sánchez, L., García-Casarrubios, E., Boscá, L., Carnovale, C. E., Casado, M., Valverde, Á. M., & Martín-Sanz, P. (2015). Hepatic cyclooxygenase-2 expression protects against diet-induced steatosis, obesity, and insulin resistance. *Diabetes*, **64**(5), 1522–1531.
47. Francés, D. E., Ronco, M. T., Ingaramo, P. I., Monti, J. A, Pisani, G. B., Parody, J. P., Pellegrino, J. M., Carrillo, M. C., Martín-Sanz, P., & Carnovale, C. E. (2011). Role of reactive oxygen species in the early stages of liver regeneration in streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radical Research*, **45**(10), 1143–1153.
48. Francés, D. E., Ronco, M. T., Ochoa, E., Alvarez, M. L., Quiroga, A., Parody, J. P., Monti, J., Carrillo, M. C., & Carnovale, C. E. (2007). Oxidative stress in primary culture hepatocytes isolated from partially hepatectomized rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **85**(10), 1047–1051.

49. Friedman, S. L. (2008). Hepatic fibrosis-Overview. *Toxicology*, **254**(3), 120–129.
50. Friedman, S. L. (2008). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*, **134**(6), 1655–1669.
51. Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., Mihara, M., Naitou, M., Endoh, H., Nakamura, T., Akimoto, C., Yamamoto, Y., Katagiri, T., Foulds, C., Takezawa, S., Kitagawa, H., Takeyama, K., O'Malley, B. W., & Kato, S. (2007). DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nature Cell Biology*, **9**(5), 604–611.
52. Funk, C. D. (2001). Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science*, **294**(5548), 1871–1875.
53. Futagami, S., Tatsuguchi, A., Hiratsuka, T., Shindo, T., Horie, A., Hamamoto, T., Ueki, N., Kusunoki, M., Miyake, K., Gudis, K., Tsukui, T., & Sakamoto, C. (2008). Monocyte chemoattractant protein 1 and CD40 ligation have a synergistic effect on vascular endothelial growth factor production through cyclooxygenase 2 upregulation in gastric cancer. *Journal of Gastroenterology*, **43**(3), 216–224.
54. Gao, X., Cao, Y., Yang, W., Duan, C., Aronson, J. F., Rastellini, C., Chao, C., Hellmich, M. R., & Ko, T. C. (2013). BMP2 inhibits TGF- β -induced pancreatic stellate cell activation and extracellular matrix formation. *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*, **304**, G804–G813.
55. García-Alonso, V., Titos, E., Alcaraz-Quiles, J., Rius, B., Lopategi, A., López-Vicario, C., Jakobsson, P.-J., Delgado, S., Lozano, J., & Clària, J. (2016). Prostaglandin E₂ exerts multiple regulatory actions on human obese adipose tissue remodeling, inflammation, adaptive thermogenesis and lipolysis. *PLoS ONE*, **11**(4), e0153751.
56. García-Monzón, C., Lo Iacono, O., Mayoral, R., González-Rodríguez, Á., Miquilena-Colina, M. E., Lozano-Rodríguez, T., García-Pozo, L., Vargas-Castrillón, J., Casado,

- M., Boscá, L., Valverde, Á. M., & Martín-Sanz, P. (2011). Hepatic insulin resistance is associated with increased apoptosis and fibrogenesis in nonalcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*, **54**(1), 142–152.
57. Garrison, G., Huang, S. K., Okunishi, K., Scott, J. P., Penke, L. R. K., Scruggs, A. M., & Peters-Golden, M. (2013). Reversal of myofibroblast differentiation by prostaglandin E₂. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **48**(5), 550–558.
58. Giannitrapani, L., Ingrao, S., Soresi, M., Florena, A. M., Spada, E. La, Sandonato, L., D'Alessandro, N., Cervello, M., & Montalto, G. (2009). Cyclooxygenase-2 expression in chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma: An immunohistochemical study. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1155**, 293–299.
59. Gitlin, J. M., & Loftin, C. D. (2009). Cyclooxygenase-2 inhibition increases lipopolysaccharide-induced atherosclerosis in mice. *Cardiovascular Research*, **81**(2), 400–407.
60. Harper, K. A., & Tyson-Capper, A. J. (2008). Complexity of COX-2 gene regulation. *Biochemical Society Transactions*, **36**(3), 543–545.
61. Harris, S. G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D., & Phipps, R. P. (2002). Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in Immunology*, **23**(3), 144–150.
62. Hassan, Z. K., & Al-Olayan, E. M. (2012). Curcumin reorganizes miRNA expression in a mouse model of liver fibrosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, **13**(11), 5405–5408.
63. He, X.-P., Shao, Y., Li, X.-L., Xu, W., Chen, G.-S., Sun, H.-H., Xu, H.-C., Xu, X., Tang, D., Zheng, X.-F., Xue, Y.-P., Huang, G.-C., & Sun, W.-H. (2012). Downregulation of miR-101 in gastric cancer correlates with cyclooxygenase-2 overexpression and tumor growth. *FEBS Journal*, **279**(22), 4201–4212.

64. Herrera, B., Murillo, M. M., Álvarez-Barrientos, A., Beltrán, J., Fernández, M., & Fabregat, I. (2004). Source of early reactive oxygen species in the apoptosis induced by transforming growth factor- β in fetal rat hepatocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, **36**(1), 16–26.
65. Hu, K. Q. (2003). Cyclooxygenase 2 (COX2)-prostanoid pathway and liver diseases. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **69**(5), 329–337.
66. Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2008). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, **4**(1), 44–57.
67. Hui, A. Y., Dannenberg, A. J., Sung, J. J. Y., Subbaramaiah, K., Du, B., Olinga, P., & Friedman, S. L. (2004). Prostaglandin E2 inhibits transforming growth factor β 1-mediated induction of collagen α 1(I) in hepatic stellate cells. *Journal of Hepatology*, **41**(2), 251–258.
68. Hui, A. Y., Leung, W. K., Yuen Chan, H. L., Chan, F. K. L., Yin Go, M. Y., Chan, K. K., Tang, B. D., Chu, E. S. H., & Sung, J. J. Y. (2006). Effect of celecoxib on experimental liver fibrosis in rat. *Liver International*, **26**(1), 125–136.
69. Ibrahim, S. H., Hirsova, P., Malhi, H., & Gores, G. J. (2016). Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. *Digestive Diseases and Sciences*, **61**(5), 1325–1336.
70. Itagaki, H., Shimizu, K., Morikawa, S., Ogawa, K., & Ezaki, T. (2013). Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine-choline-deficient diet in C57BL/6 mice. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, **6**(12), 2683–2696.
71. Jiang, Q., Liu, Y., Zhang, S., Li, N., & Sun, G. (2016). MiR-26b suppresses cell proliferation and invasion by targeting cyclooxygenase 2 in human glioblastoma. *Oncotarget*, October 17, 2016: 10.18632/oncotarget.12706.

72. Jiang, X.-P., Ai, W.-B., Wan, L.-Y., Zhang, Y.-Q., & Wu, J.-F. (2017). The roles of microRNA families in hepatic fibrosis. *Cell & Bioscience*, **7**(1), 34.
73. Kamada, Y., Mori, K., Matsumoto, H., Kiso, S., Yoshida, Y., Shinzaki, S., Hiramatsu, N., Ishii, M., Moriwaki, K., Kawada, N., Takehara, T., & Miyoshi, E. (2012). N-Acetylglucosaminyltransferase V regulates TGF- β response in hepatic stellate cells and the progression of steatohepatitis. *Glycobiology*, **22**(6), 778–787.
74. Kamata, M., Hosono, K., Fujita, T., Kamata, K., & Majima, M. (2015). Role of cyclooxygenase-2 in the development of interstitial fibrosis in kidneys following unilateral ureteral obstruction in mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **70**(C), 174–180.
75. Kang, Y.-J., Mbonye, U. R., DeLong, C. J., Wada, M., & Smith, W. L. (2007). Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. *Progress in Lipid Research*, **46**(2), 108–125.
76. Karlmark, K. R., Weiskirchen, R., Zimmermann, H. W., Gassler, N., Ginhoux, F., Weber, C., Merad, M., Luedde, T., Trautwein, C., & Tacke, F. (2009). Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1⁺ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology*, **50**(1), 261–274.
77. Kataoka, K., Takikawa, Y., Lin, S. De, & Suzuki, K. (2005). Prostaglandin E2 receptor EP4 agonist induces Bcl-xL and independently activates proliferation signals in mouse primary hepatocytes. *Journal of Gastroenterology*, **40**(6), 610–616.
78. Kim, S. M., Park, K. C., Kim, H. G., & Han, S. J. (2008). Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor meloxicam on liver fibrosis in rats with ligated common bile ducts. *Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology*, **38**(8), 800–809.
79. Kimura, N., Matsuo, R., Shibuya, H., Nakashima, K., & Taga, T. (2000). BMP2-induced apoptosis is mediated by activation of the TAK1-p38 kinase pathway that is

- negatively regulated by Smad6. *Journal of Biological Chemistry*, **275**(23), 17647–17652.
80. Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., Ferrell, L. D., Liu, Y.-C., Torbenson, M. S., Unalp-Arida, A., Yeh, M., McCullough, A. J., & Sanyal, A. J. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, **41**(6), 1313–1321.
81. Knabel, M. K., Ramachandran, K., Karhadkar, S., Hwang, H. W., Creamer, T. J., Chivukula, R. R., Sheikh, F., Clark, K. R., Torbenson, M., Montgomery, R. A., Cameron, A. M., Mendell, J. T., & Warren, D. S. (2015). Systemic delivery of scAAV8-encoded MiR-29a ameliorates hepatic fibrosis in carbon tetrachloride-treated mice. *PLoS ONE*, **10**(4), e0124411.
82. Koide, S., Kobayashi, Y., Oki, Y., & Nakamura, H. (2004). Prostaglandin E₂ inhibits platelet-derived growth factor-stimulated cell proliferation through a prostaglandin E receptor EP2 subtype in rat hepatic stellate cells. *Digestive Diseases and Sciences*, **49**(9), 1394–1400.
83. Korbecki, J., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., & Chlubek, D. (2014). Cyclooxygenase pathways. *Acta Biochimica Polonica*, **61**(4), 639–649.
84. Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, **11**(9), 597–610.
85. Kroll, B., Kunz, S., Tu, N., & Schwarz, L. R. (1998). Inhibition of transforming growth factor-beta1 and UV light-induced apoptosis by prostanoids in primary cultures of rat hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **152**(1), 240–250.
86. Kwiecinski, M., Noetel, A., Elfimova, N., Trebicka, J., Schievenbusch, S., Strack, I., Molnar, L., von Brandenstein, M., Töx, U., Nischt, R., Coutelle, O., Dienes, H. P., & Odenthal, M. (2011). Hepatocyte growth factor (HGF) inhibits collagen I and IV synthesis in hepatic stellate cells by miRNA-29 induction. *PLoS ONE*, **6**(9), e24568.

87. Leclercq, I. A., Farrell, G. C., Sempoux, C., Peña, A. Dela, & Horsmans, Y. (2004). Curcumin inhibits NF- κ B activation and reduces the severity of experimental steatohepatitis in mice. *Journal of Hepatology*, **41**(6), 926–934.
88. Lee, Y.-C., Chang, C.-H., Lin, J.-W., Chen, H.-C., Lin, M.-S., & Lai, M.-S. (2012). Non-steroidal anti-inflammatory drugs use and risk of upper gastrointestinal adverse events in cirrhotic patients. *Liver International*, **32**(5), 859–866.
89. Lee, Y.-J., Cho, H.-N., Soh, J.-W., Jhon, G. J., Cho, C.-K., Chung, H.-Y., Bae, S., Lee, S.-J., & Lee, Y.-S. (2003). Oxidative stress-induced apoptosis is mediated by ERK1/2 phosphorylation. *Experimental Cell Research*, **291**, 251–266.
90. Leslie, C. C. (2004). Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A₂. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **70**(4), 373–376.
91. Li, J., Liu, P., Zhang, R., Cao, L., Qian, H., Liao, J., Xu, W., Wu, M., & Yin, Z. (2011). Icaritin induces cell death in activated hepatic stellate cells through mitochondrial activated apoptosis and ameliorates the development of liver fibrosis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **137**, 714–723.
92. Li, J. L., Cai, W. S., Shen, F., Feng, Z., Zhu, G. H., Cao, J., & Xu, B. (2014). Protease-activated receptor-2 modulates hepatic stellate cell collagen release and apoptotic status. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **545**, 162–166.
93. Liang, W., Menke, A. L., Driessen, A., Koek, G. H., Lindeman, J. H., Stoop, R., Havekes, L. M., Kleemann, R., & Van Den Hoek, A. M. (2014). Establishment of a general NAFLD scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology. *PLoS ONE*, **9**(12), 1–17.
94. Liedtke, C., Luedde, T., Sauerbruch, T., Scholten, D., Streetz, K., Tacke, F., Tolba, R., Trautwein, C., Trebicka, J., & Weiskirchen, R. (2013). Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, **6**(1), 19.

95. Lim, Y.-S., Lee, H. C., & Lee, H.-S. (2007). Switch of cadherin expression from E- to N-type during the activation of rat hepatic stellate cells. *Histochemistry and Cell Biology*, **127**, 149–160.
96. Lino Cardenas, C. L., Henaoui, I. S., Courcot, E., Roderburg, C., Cauffiez, C., Aubert, S., Copin, M.-C., Wallaert, B., Glowacki, F., Dewaeles, E., Milosevic, J., Maurizio, J., Tedrow, J., Marcet, B., Lo-Guidice, J.-M., Kaminski, N., Barbry, P., Luedde, T., Perrais, M., Mari, B., & Pottier, N. (2013). miR-199a-5p Is Upregulated during Fibrogenic Response to Tissue Injury and Mediates TGFbeta-Induced Lung Fibroblast Activation by Targeting Caveolin-1. *PLoS Genetics*, **9**(2), e1003291.
97. Liong, E. C., Xiao, J., Lau, T. Y. H., Nanji, A. A., & Tipoe, G. L. (2012). Cyclooxygenase inhibitors protect D-galactosamine/lipopolysaccharide induced acute hepatic injury in experimental mice model. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, **50**(3–4), 861–866.
98. Liu, S., Ji, Y., Yao, J., Zhao, X., Xu, H., Guan, Y., Breyer, R. M., Sheng, H., & Zhu, J. (2016). Knockout of the Prostaglandin E₂ Receptor Subtype 3 Promotes Eccentric Cardiac Hypertrophy and Fibrosis in Mice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, (20), 1-12.
99. Loomba, R., Quehenberger, O., Armando, A., & Dennis, E. A. (2015). Polyunsaturated fatty acid metabolites as novel lipidomic biomarkers for noninvasive diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Lipid Research*, **56**(1), 185–192.
100. Lu, L., Byrnes, K., Han, C., Wang, Y., & Wu, T. (2014). MiR-21 Targets 15-PGDH and Promotes Cholangiocarcinoma Growth. *Molecular Cancer Research*, **12**(6), 890–900.
101. Madsen, L., Pedersen, L. M., Lillefosse, H. H., Fjære, E., Bronstad, I., Hao, Q., Petersen, R. K., Hallenborg, P., Ma, T., De Matteis, R., Araujo, P., Mercader, J., Bonet, M. L., Hansen, J. B., Cannon, B., Nedergaard, J., Wang, J., Cinti, S., Voshol, P., Døskeland, S. O., & Kristiansen, K. (2010). UCP1 induction during recruitment of

- brown adipocytes in white adipose tissue is dependent on cyclooxygenase activity. *PLoS ONE*, **5**(6), e11391.
102. Majumder, M., Landman, E., Liu, L., Hess, D., & Lala, P. K. (2015). COX-2 Elevates Oncogenic miR-526b in Breast Cancer by EP4 Activation. *Molecular Cancer Research*, **13**(6), 1022–1033.
103. Malarkey, D. E., Johnson, K., Ryan, L., Boorman, G., & Maronpot, R. R. (2005). New Insights into Functional Aspects of Liver Morphology. *Toxicologic Pathology*, **33**(1), 27–34.
104. Marra, F., Gastaldelli, A., Svegliati Baroni, G., Tell, G., & Tiribelli, C. (2008). Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends in Molecular Medicine*, **14**(2), 72–81.
105. Martín-Sanz, P., Callejas, N. A., Casado, M., Díaz-Guerra, M. J. M., & Boscá, L. (1998). Expression of cyclooxygenase-2 in foetal rat hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide and pro-inflammatory cytokines. *British Journal of Pharmacology*, **125**(6), 1313–1319.
106. Mas, E., Danjoux, M., Garcia, V., Carpentier, S., Ségul, B., & Levade, T. (2009). IL-6 deficiency attenuates murine diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS ONE*, **4**(11), 1–10.
107. Mayoral, R., Mollá, B., Flores, J. M., Boscá, L., Casado, M., & Martín-Sanz, P. (2008). Constitutive expression of cyclo-oxygenase 2 transgene in hepatocytes protects against liver injury. *The Biochemical Journal*, **416**(3), 337–346.
108. Mederacke, I., Dapito, D. H., Affò, S., Uchinami, H., & Schwabe, R. F. (2015). High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers. *Nature Protocols*, **10**(2), 305–315.

109. Menter, D. G., Schilsky, R. L., & DuBois, R. N. (2010). Cyclooxygenase-2 and Cancer Treatment: Understanding the Risk Should Be Worth the Reward. *Clinical Cancer Research*, **16**(5), 1384–1390.
110. Mitchell, C., Couton, D., Couty, J.-P., Anson, M., Crain, A.-M., Bizet, V., Rénia, L., Pol, S., Mallet, V., & Gilgenkrantz, H. (2009). Dual Role of CCR2 in the Constitution and the Resolution of Liver Fibrosis in Mice. *The American Journal of Pathology*, **174**(5), 1766–1775.
111. Miura, K., Yang, L., van Rooijen, N., Ohnishi, H., & Seki, E. (2012). Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, **302**(11), G1310–G1321.
112. Morinaga, H., Mayoral, R., Heinrichsdorff, J., Osborn, O., Franck, N., Hah, N., Walenta, E., Bandyopadhyay, G., Pessentheiner, A. R., Chi, T. J., Chung, H., Bogner-Strauss, J. G., Evans, R. M., Olefsky, J. M., & Oh, D. Y. (2015). Characterization of distinct subpopulations of hepatic macrophages in HFD/obese mice. *Diabetes*, **64**(4), 1120–1130.
113. Motiño, O., Francés, D. E., Mayoral, R., Castro-Sánchez, L., Fernández-Velasco, M., Boscá, L., García-Monzón, C., Brea, R., Casado, M., Agra, N., & Martín-Sanz, P. (2015). Regulation of MicroRNA 183 by Cyclooxygenase 2 in Liver Is DEAD-Box Helicase p68 (DDX5) Dependent: Role in Insulin Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, **35**(14), 2554–2567.
114. Murakami, Y., Toyoda, H., Tanaka, M., Kuroda, M., Harada, Y., Matsuda, F., Tajima, A., Kosaka, N., Ochiya, T., & Shimotohno, K. (2011). The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families. *PLoS ONE*, **6**(1), e16081.
115. Musso, G., Cassader, M., & Gambino, R. (2016). Non-alcoholic steatohepatitis: emerging molecular targets and therapeutic strategies. *Nature Reviews Drug Discovery*, **15**(4), 249–274.

116. Núñez, O., Fernández-Martínez, A., Majano, P. L., Apolinario, A., Gómez-Gonzalo, M., Benedicto, I., López-Cabrera, M., Boscá, L., Clemente, G., García-Monzón, C., & Martín-Sanz, P. (2004). Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. *Gut*, **53**(11), 1665–1672.
117. Núñez-Martínez, Ó., Clemente-Ricote, G., & García-Monzón, C. (2003). Papel de la ciclooxigenasa 2 en la patogenia de las enfermedades del hígado. *Medicina Clínica (Barcelona)*, **121**(19), 743–748.
118. Obernosterer, G., Leuschner, P. J. F., Alenius, M., & Martinez, J. (2006). Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, **12**, 1161–1167.
119. Obstfeld, A. E., Sugaru, E., Thearle, M., Francisco, A., Gayet, C., Ginsberg, H. N., Ables, E. V., & Jr, A. W. F. (2010). C-C Chemokine Receptor 2 (CCR2) Regulates the Hepatic Recruitment of Myeloid Cells That Promote Obesity-Induced Hepatic Steatosis. *Diabetes*, **59**(April), 916-925.
120. O’Callaghan, G., & Houston, A. (2015). Prostaglandin E₂ and the EP receptors in malignancy: Possible therapeutic targets? *British Journal of Pharmacology*, **172**(22), 5239–5250.
121. Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, **95**(2), 351–358.
122. Paik, Y.-H., Kim, J. K., Lee, J. I., Kang, S. H., Kim, D. Y., An, S. H., Lee, S. J., Lee, D. K., Han, K.-H., Chon, C. Y., Lee, S. I., Lee, K. S., & Brenner, D. A. (2009). Celecoxib induces hepatic stellate cell apoptosis through inhibition of Akt activation and suppresses hepatic fibrosis in rats. *Gut*, **58**(11), 1517–1527.
123. Pardo, V., González-Rodríguez, Á., Guijas, C., Balsinde, J., & Valverde, Á. M. (2015). Opposite cross-talk by oleate and palmitate on insulin signaling in hepatocytes

- through macrophage activation. *Journal of Biological Chemistry*, **290**(18), 11663–11677.
124. Parente, L., & Perretti, M. (2003). Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: Two enzymes in the spotlight. *Biochemical Pharmacology*, **65**(2), 153–159.
125. Park, J. Y., Pillinger, M. H., & Abramson, S. B. (2006). Prostaglandin E₂ synthesis and secretion: The role of PGE₂ synthases. *Clinical Immunology*, **119**(3), 229–240.
126. Penke, L. R. K., Huang, S. K., White, E. S., & Peters-Golden, M. (2014). Prostaglandin E₂ inhibits α -smooth muscle actin transcription during myofibroblast differentiation via distinct mechanisms of modulation of serum response factor and myocardin-related transcription factor-A. *Journal of Biological Chemistry*, **289**(24), 17151–17162.
127. Pomianowska, E., Sandnes, D., Grzyb, K., Schjølberg, A. R., Aasrum, M., Tveteraas, I. H., Tjomsland, V., Christoffersen, T., & Gladhaug, I. P. (2014). Inhibitory effects of prostaglandin E₂ on collagen synthesis and cell proliferation in human stellate cells from pancreatic head adenocarcinoma. *BMC Cancer*, **14**(1), 413.
128. Ricciotti, E., & FitzGerald, G. A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **31**(5), 986–1000.
129. Roderburg, C., & Trautwein, C. (2017). Cell-specific functions of miRNA in the liver. *Journal of Hepatology*, **66**(3), 655–656.
130. Roderburg, C., Urban, G.-W., Bettermann, K., Vucur, M., Zimmermann, H., Schmidt, S., Janssen, J., Koppe, C., Knolle, P., Castoldi, M., Tacke, F., Trautwein, C., & Luedde, T. (2011). Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology*, **53**(1), 209–218.
131. Rolfe, M. W., Kunkel, S. L., Standiford, T. J., Orringer, M. B., Phan, S. H., Evanoff, H. L., Burdick, M. D., & Strieter, R. M. (1992). Expression and regulation of human

- pulmonary fibroblast-derived monocyte chemotactic peptide-1. *The American Journal of Physiology*, **263**(0002–9513), L536–L545.
132. Roy, S., Benz, F., Luedde, T., & Roderburg, C. (2015). The role of miRNAs in the regulation of inflammatory processes during hepatofibrogenesis. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, **4**(6), 24–33.
133. Rudnick, D. A., Perlmutter, D. H., & Muglia, L. J. (2001). Prostaglandins are required for CREB activation and cellular proliferation during liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, **98**(15), 8885–8890.
134. Sagiv, E., Rozovski, U., Kazanov, D., Liberman, E., & Arber, N. (2007). Gene expression analysis proposes alternative pathways for the mechanism by which celecoxib selectively inhibits the growth of transformed but not normal enterocytes. *Clinical Cancer Research*, **13**(22), 6807–6815.
135. Sanz-Garcia, C., Ferrer-Mayorga, G., González-Rodríguez, Á., Valverde, Á. M., Martín-Duce, A., Velasco-Martín, J. P., Regadera, J., Fernández, M., & Alemany, S. (2013). Sterile inflammation in acetaminophen-induced liver injury is mediated by Cot/tpl2. *Journal of Biological Chemistry*, **288**(21), 15342–15351.
136. Schon, H.-T., Bartneck, M., Borkham-Kamphorst, E., Nattermann, J., Lammers, T., Tacke, F., & Weiskirchen, R. (2016). Pharmacological Intervention in Hepatic Stellate Cell Activation and Hepatic Fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, **7**, 33.
137. Schuppan, D., & Schattenberg, J. M. (2013). Non-alcoholic steatohepatitis: Pathogenesis and novel therapeutic approaches. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **28**, 68–76.
138. Seo, M. J., & Oh, D. K. (2017). Prostaglandin synthases: Molecular characterization and involvement in prostaglandin biosynthesis. *Progress in Lipid Research*, **66**, 50–68.

139. Shi, X., & Teng, F. (2015). Down-regulated miR-28-5p in human hepatocellular carcinoma correlated with tumor proliferation and migration by targeting insulin-like growth factor-1 (IGF-1). *Molecular and Cellular Biochemistry*, **408**, 283–293.
140. Shrestha, N., Chand, L., Han, M. K., Lee, S. O., Kim, C. Y., & Jeong, Y. J. (2016). Glutamine inhibits CCl₄ induced liver fibrosis in mice and TGF- β 1 mediated epithelial-mesenchymal transition in mouse hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*, **93**, 129–137.
141. Simmons, D. L., Botting, R. M., & Hla, T. (2004). Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacological Reviews*, **56**(3), 387–437.
142. Smith, W. L. (1992). Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *The American Journal of Physiology, Renal Fluid Electrolyte Physiology*, **263**(32), F181–F191.
143. Smith, W. L., DeWitt, D. L., & Garavito, R. M. (2000). CYCLOOXYGENASES: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annual Review of Biochemistry*, **69**(1), 145–182.
144. Smith, W. L., Garavito, R. M., & DeWitt, D. L. (1996). Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**(52), 33157–33160.
145. Song, T., Zhang, X., Wang, C., Wu, Y., Dong, J., Gao, J., Cai, W., & Hong, B. (2011). Expression of miR-143 Reduces Growth and Migration of Human Bladder Carcinoma Cells by Targeting Cyclooxygenase-2. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention APJCP*, **12**(4), 929–933.
146. Sun, B., Zhang, X., Cheng, X., Zhang, Y., Chen, L., Shi, L., Liu, Z., Qian, H., Wu, M., & Yin, Z. (2013). Intratumoral hepatic stellate cells as a poor prognostic marker and a new treatment target for hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE*, **8**(11), e80212.

147. Tacke, F., & Weiskirchen, R. (2012). Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*, **6**(1), 67–80.
148. Takahashi, Y., Soejima, Y., & Fukusato, T. (2012). Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/ nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, **18**(19), 2300–2308.
149. Tanabe, T., & Tohnai, N. (2002). Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, **68–69**, 95–114.
150. Thapaliya, S., Wree, A., Povero, D., Inzaugarat, M. E., Berk, M., Dixon, L., Papouchado, B. G., & Feldstein, A. E. (2014). Caspase 3 inactivation protects against hepatic cell death and ameliorates fibrogenesis in a diet-induced NASH model. *Digestive Diseases and Sciences*, **59**(6), 1197–1206.
151. Tietze, F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*, **27**, 502–522.
152. Trusca, V. G., Fuior, E. V., Florea, I. C., Kardassis, D., Simionescu, M., & Gafencu, A. V. (2011). Macrophage-specific up-regulation of apolipoprotein E gene expression by STAT1 is achieved via long range genomic interactions. *Journal of Biological Chemistry*, **286**(16), 13891–13904.
153. Tu, C. T., Guo, J. S., Wang, M., & Wang, J. Y. (2007). Antifibrotic activity of rofecoxib *in vivo* is associated with reduced portal hypertension in rats with carbon tetrachloride-induced liver injury. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, **22**(6), 877–884.
154. Vancheri, C., Mastruzzo, C., Sortino, M. A., & Crimi, N. (2004). The lung as a privileged site for the beneficial actions of PGE₂. *Trends in Immunology*, **25**(1), 40–46.

155. Vandeputte, C., Guizon, I., Genestie-Denis, I., Vannier, B., & Lorenzon, G. (1994). A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biology and Toxicology*, **10**(5–6), 415–421.
156. Varga, Z., Sabzwari, S. R. A., & Vargova, V. (2017). Cardiovascular Risk of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: An Under-Recognized Public Health Issue. *Cureus*, **9**(4), e1144.
157. Vonghia, L., Michielsen, P., & Francque, S. (2013). Immunological mechanisms in the pathophysiology of non-alcoholic steatohepatitis. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**(10), 19867–19890.
158. Wang, D., & Dubois, R. N. (2010). Eicosanoids and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, **10**(3), 181–193.
159. Wang, J., Chu, E. S. H., Chen, H.-Y., Man, K., Go, M. Y. Y., Huang, X. R., Lan, H. Y., Sung, J. J. Y., & Yu, J. (2014). microRNA-29b prevents liver fibrosis by attenuating hepatic stellate cell activation and inducing apoptosis through targeting PI3K/AKT pathway. *Oncotarget*, **6**(9), 7325–7338.
160. Wettlaufer, S. H., Scott, J. P., McEachin, R. C., Peters-Golden, M., & Huang, S. K. (2016). Reversal of the transcriptome by prostaglandin E₂ during Myofibroblast dedifferentiation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **54**(1), 114–127.
161. Williams, C. S., & DuBois, R. N. (1996). Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *American Journal of Physiology, Gastrointestinal Liver Physiology*, **270**(33), G393–G400.
162. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, **11**(3), 228–234.

163. Wong, V. W.-S., Chitturi, S., Wong, G. L.-H., Yu, J., Chan, H. L.-Y., & Farrell, G. C. (2016). Pathogenesis and novel treatment options for non-alcoholic steatohepatitis. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, **1**(1), 56–67.
164. Wu, J., Chen, C., Hu, X., Cai, X., Guan, Y., Hu, H., Wang, Q., Chen, X., Cai, B., & Jing, X. (2016). Suppressing Cyclooxygenase-2 Prevents nonalcoholic and inhibits apoptosis of hepatocytes that are involved in the Akt/p53 signal pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **469**(4), 1034–1040.
165. Xu, Q., Nakayama, M., Suzuki, Y., Sakai, K., Nakamura, T., Sakai, Y., & Matsumoto, K. (2012). Suppression of acute hepatic injury by a synthetic prostacyclin agonist through hepatocyte growth factor expression. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, **302**(4), G420-G429.
166. Yang, F., Lu, J., Yu, Y., & Gong, Y. (2017). Epithelial to mesenchymal transition in Cyclosporine A-induced rat gingival overgrowth. *Archives of Oral Biology*, **81**, 48–55.
167. Yang, H. J., Jiang, J. H., Yang, Y. T., Yang, X. D., Guo, Z., Qi, Y. P., Zeng, F. H., Zhang, K. L., Chen, N. Z., Xiang, B. D., & Li, L. Q. (2016). Cyclooxygenase-2 expression is associated with initiation of hepatocellular carcinoma, while prostaglandin receptor-1 expression predicts survival. *World Journal of Gastroenterology*, **22**(39), 8798–8805.
168. Yang, L., Roh, Y. S., Song, J., Zhang, B., Liu, C., Loomba, R., & Seki, E. (2014). Transforming growth factor beta signaling in hepatocytes participates in steatohepatitis through regulation of cell death and lipid metabolism in mice. *Hepatology*, **59**(2), 483–495.
169. Yu, J., Ip, E., Dela Peña, A., Jing, Y. H., Sessa, J., Pera, N., Hall, P., Kirsch, R., Leclercq, I., & Farrell, G. C. (2006). COX-2 induction in mice with experimental nutritional steatohepatitis: Role as pro-inflammatory mediator. *Hepatology*, **43**(4), 826–836.

170. Yu, J., Wu, C. W., Chu, E. S. H., Hui, A. Y., Cheng, A. S. L., Go, M. Y. Y., Ching, A. K. K., Chui, Y. L., Chan, H. L. Y., & Sung, J. J. Y. (2008). Elucidation of the role of COX-2 in liver fibrogenesis using transgenic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **372**(4), 571–577.
171. Zhou, S. L., Hu, Z. Q., Zhou, Z. J., Dai, Z., Wang, Z., Cao, Y., Fan, J., Huang, X. W., & Zhou, J. (2016). miR-28-5p-IL-34-macrophage feedback loop modulates hepatocellular carcinoma metastasis. *Hepatology*, **63**(5), 1560–1575.
172. Zhou, X., Wen, W., Shan, X., Qian, J., Li, H., Jiang, T., Wang, W., Cheng, W., Wang, F., Qi, L., Ding, Y., Liu, P., Zhu, W., & Chen, Y. (2016). MiR-28-3p as a potential plasma marker in diagnosis of pulmonary embolism. *Thrombosis Research*, **138**, 91–95.
173. Zoubek, M. E., Trautwein, C., & Strnad, P. (2017). Reversal of liver fibrosis: From fiction to reality. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, **31**(2), 129–141.

Anexo

Publicaciones derivadas del presente trabajo.

1. Motiño, O., Agra, N., Brea Contreras, R., Domínguez-Moreno, M., García-Monzón, C., Vargas-Castrillón, J., Carnovale, C. E., Boscá, L., Casado, M., Mayoral, R., Valdecantos, M. P., Valverde, Á. M., Francés, D. E., & Martín-Sanz, P. (2016). Cyclooxygenase-2 expression in hepatocytes attenuates non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in mice. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, **1862**(9), 1710–1723.
2. Brea R., Motiño O., Francés D., García-Monzón C., Vargas J., Fernández-Velasco M., Boscá L., Casado M., Martín-Sanz P. & Agra N. (2017). PGE₂ induces apoptosis of hepatic stellate cells and attenuates liver fibrosis in mice by downregulating miR-23a-5p and miR-28a-5p. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. **1864**: 325-337.

Otras publicaciones en las que la doctoranda ha participado durante el transcurso de la tesis.

3. Motiño, O., Francés, D. E., Mayoral, R., Castro-Sánchez, L., Fernández-Velasco, M., Boscá, L., García-Monzón, C., Brea, R., Casado, M., Agra, N., & Martín-Sanz, P. (2015). Regulation of MicroRNA 183 by Cyclooxygenase 2 in Liver Is DEAD-Box Helicase p68 (DDX5) Dependent: Role in Insulin Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, **35**(14), 2554–2567.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbadis

Cyclooxygenase-2 expression in hepatocytes attenuates non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in mice



Omar Motiño ^{a,1}, Noelia Agra ^{a,1}, Rocío Brea Contreras ^{a,1}, Marina Domínguez-Moreno ^a, Carmelo García-Monzón ^b, Javier Vargas-Castrillón ^b, Cristina E. Carnovale ^c, Lisardo Boscá ^{a,f}, Marta Casado ^{d,f}, Rafael Mayoral ^g, M. Pilar Valdecantos ^a, Ángela M. Valverde ^{a,e}, Daniel E. Francés ^{e,*,2}, Paloma Martín-Sanz ^{a,b,f,*,2}

^a Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) "Alberto Sols", CSIC-UAM, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain

^b Liver Research Unit, Hospital Universitario Santa Cristina, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, Amadeo Vives 2, 28009 Madrid, Spain

^c Instituto de Fisiología Experimental (IFE-CONICET), Suipacha 570, 2000 Rosario, Argentina

^d Instituto de Biomedicina de Valencia, IIV-CSIC, Jaime Roig 11, 46010 Valencia, Spain

^e Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERdem), Monforte de Lemos 3-5, 28029 Madrid, Spain

^f Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERhd), Monforte de Lemos 3-5, 28029 Madrid, Spain

^g Department of Medicine, University of California, San Diego, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093, USA

article info

Article history:

Received 1 March 2016

Received in revised form 7 June 2016

Accepted 13 June 2016

Available online 15 June 2016

Keywords:

COX-2

Liver

Steatohepatitis

Inflammation

Fibrosis

abstract

Cyclooxygenase-2 (COX-2) is involved in different liver diseases but little is known about the significance of COX-2 in the development and progression of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). This study was designed to elucidate the role of COX-2 expression in hepatocytes in the pathogenesis of steatohepatitis and hepatic fibrosis. In the present work, hepatocyte-specific COX-2 transgenic mice (hCOX-2-Tg) and their wild-type (Wt) littermates were either fed methionine-and-choline deficient (MCD) diet to establish an experimental non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model or injected with carbon tetrachloride (CCl₄) to induce liver fibrosis. In our animal model, hCOX-2-Tg mice fed MCD diet showed lower grades of steatosis, ballooning and inflammation than Wt mice, in part by reduced recruitment and infiltration of hepatic macrophages, with a corresponding decrease in serum levels of pro-inflammatory cytokines. Furthermore, hCOX-2-Tg mice showed a significant attenuation of the MCD diet-induced increase in oxidative stress and hepatic apoptosis observed in Wt mice. Even more, hCOX-2-Tg mice treated with CCl₄ had significantly lower stages of fibrosis and less hepatic content of collagen, hydroxyproline and pro-fibrogenic markers than Wt controls. Collectively, our data indicates that constitutive hepatocyte COX-2 expression ameliorates NASH and liver fibrosis development in mice by reducing inflammation, oxidative stress and apoptosis and by modulating activation of hepatic stellate cells, respectively, suggesting a possible protective role for COX-2 induction in NASH/NAFLD progression.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 catalyze the first step in prostanoïd biosynthesis. COX-1 is constitutively expressed in many tissues,

whereas COX-2 is induced by a variety of stimuli [1]. Adult hepatocytes fail to induce COX-2 expression regardless of the pro-inflammatory factors used [2]. However, our group and others demonstrated that partial hepatectomy (PH) induced COX-2 in hepatocytes and contributed to

Abbreviations: COX-2, cyclooxygenase-2; PGE₂, prostaglandin E₂; RCD, regular chow diet; MCD, methionine and choline deficient diet; CCl₄, carbon tetrachloride; NAFLD non-alcoholic fatty liver disease; NL, normal liver; NAS, non-alcoholic steatosis; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; TG, triglycerides; ALT, alanine transaminase; IL-6, interleukin 6; IL-1β, interleukin 1β; TNF-α, tumor necrosis factor α; TGF-β1, transforming growth factor β1; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; CCR2, C-C chemokine receptor type 2; Ly6C, lymphocyte antigen 6C; Bax, Bcl-2-associated X protein; Bcl-xL, B-cell lymphoma-extra-large; Mcl-1, myeloid cell leukemia 1; DFU, (5,5-dimethyl-3-(3-fluorophenyl)-4-(4-methylsulfonyl)phenyl-2(5H)-furanone); Cat, catalase; Sod1, superoxide dismutase 1; Sod 2, superoxide dismutase 2; Gsr, glutathione reductase; α-SMA, alpha smooth muscle actin; Colla1, Collagen type I alpha 1; PDGFRA, platelet-derived growth factor receptor alpha; PDGFRB, platelet-derived growth factor receptor beta; PDGFA, platelet-derived growth factor alpha; PDGFB, platelet-derived growth factor beta; HGF, hepatocyte growth factor.

* Corresponding author.

** Correspondence to: P. Martín-Sanz, Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) "Alberto Sols", CSIC-UAM, Arturo Duperier, 4, 28029 Madrid, Spain.

E-mail addresses: frances@ife-conicet.gov.ar (D.E. Francés), pmartins@iib.uam.es (P. Martín-Sanz).

¹ These authors contributed equally to this work.

² These two authors share senior authorship.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbdis.2016.06.009>

0925-4439/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

the progression of cell cycle during regeneration [3]. In addition, expression of COX-2 has been detected in several liver pathologies [4]. On the other hand, hepatocyte-specific expression of COX-2 exerts an efficient protection against acute liver injury by an antiapoptotic/antinecrotic effect and by accelerated early hepatocyte proliferation [5].

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) encompasses from non-alcoholic steatosis (NAS), a simple accumulation of fat in hepatocytes, to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), which is characterized by lobular and portal inflammation, hepatocyte ballooning and variable degrees of fibrosis [6]. NAFLD worldwide prevalence in general population is estimated to be 20–30% in Western Countries and 5–18% in Asia and is increasing over time [7]. The causes of progression from NAS to NASH remain unclear, but lipotoxicity, oxidative stress, apoptosis and an imbalance of pro- and anti-inflammatory cytokines are believed to play key roles [8,9]. Activated Kupffer and hepatic stellate cells (HSC) contribute to pro-inflammatory cytokines production during NASH, particularly tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) [10]. NASH, in turn, can progress to fibrosis and the main cell type responsible for extracellular matrix (ECM) deposition are activated HSCs; moreover, hepatocytes are replaced by scar tissue composed primarily of type I collagen produced by HSCs [11]. Induction of alpha-smooth muscle actin (α -SMA) is the single most reliable marker of HSC activation that secrete TGF- β 1 and respond to this cytokine increasing type I collagen deposition [12]. Hepatic TGF- β 1 expression is increased in animal models of liver fibrosis and in patients with chronic liver diseases [13] and has been inversely correlated to prostaglandin E₂ (PGE₂) action over HSCs activation [14].

Regarding COX-2 and the impact of PGE₂ on the development of NASH the data are controversial. Some studies indicate that PGs favor the development of hepatic steatosis, NASH and ultimately fibrosis [15–17], whilst others provide evidence that PGE₂ suppresses fibrogenesis and NASH progression since COX-2 inhibition potentiates inflammation and experimental liver fibrosis [14,18,19]. Our previous results indicate that constitutive expression of COX-2 in hepatocytes protects against high fat diet-induced steatosis, inflammation, obesity and insulin resistance [20]. These findings prompted us to screen the role of hepatic-specific COX-2 expression in a murine model of NASH and fibrosis induced by MCD and CCl₄ respectively.

In the present study we have demonstrated that expression of COX-2 in hepatocytes protects against NASH development by attenuating steatosis and inflammation and by inhibiting apoptotic pathways. Moreover, hepatocyte COX-2 expression was able to diminish the induction of profibrogenic markers and reduce the progression of the CCl₄-induced fibrotic process by restricting HSC activation and ECM deposition. These data confirm that constitutive COX-2 expression has a hepatoprotective role in NASH and liver fibrosis murine models.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA), Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), Cell Signaling (Danvers, MA, USA) and Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Reagents were from Roche Diagnostics (Basel, Switzerland) or Sigma Chemical Co. Reagents for electrophoresis were obtained from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Tissue culture dishes were from Falcon (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA). Tissue culture media were from Gibco (Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA).

2.2. Animal experimentation

hCOX-2-Tg mice and their corresponding wild type (Wt) littermates were generated by systematic mating of the heterozygous B6D2-Tg (APOE-PTGS2/4)Upme expressing 55 copies of transgene with B6D2F1/OlaHsd Wt mice in our animal house for more than

seven generations. The hCOX-2-Tg animals were phenotypically similar to their normal litter-mates and did not exhibit a detectable histological change in the liver at 12-weeks of age. Integration of transgene was systematically checked by PCR analysis of genomic tail DNA. Transgenic mice (hCOX-2-Tg) constitutively express human COX-2 in hepatocytes under the control of the human ApoE promoter and its specific hepatic control region (HCR), a unique regulatory domain that directs ApoE expression in the liver [21], lacking macrophage-specific regulatory regions (ME.2 and ME.1) [22]. The animals were maintained in light/dark (12 h light/12 h dark), temperature (22 °C) and humidity-controlled rooms with free access to drinking water. Mice were fed with regular chow diet (RCD; SAFE A04-10 Panlab, Barcelona) or methionine choline-deficient diet (MCD; TD-90262 Harland-Tecklad, Indianapolis, IN) for 2 and 4 weeks. Some of the Wt and hCOX-2-Tg mice ($n = 6$) were fed with MCD diet for 4 weeks and then with RCD diet for another 5 days as a diet recovery model (reverse protocol) (R). To induce fibrosis, CCl₄ (1:4 in olive oil) was intraperitoneally (i.p.) administered to hCOX-2-Tg and Wt mice at a dose of 1.6 ml/kg body weight twice-weekly. Control animals were i.p. injected with olive oil. During MCD diet treatment, body weight and food intake were examined every two days. 2 wk, 4 wk and 4 wk + R after MCD diet or 9 wk after CCl₄ treatment, the animals were sacrificed and the liver was snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C, collected in a solution containing 30% sucrose in PBS or fixed in 10% buffered formalin. Plasma was obtained from the inferior cava vein.

All animal experimentation was controlled following the recommendations of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) on health monitoring, and of the National Institutes of health guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) whereas use of animals in experimental procedures was approved by the Institutional Care Instructions (Bioethical Commission from Spanish National Research Council, Spain).

2.3. Histopathology assessment

Hematoxylin-Eosin (H&E) and Masson's trichrome-stained (MTC) paraffin-embedded liver biopsy sections from studied mice were evaluated by the same experienced liver pathologist (J.V.-C) blinded to the features of animal groups. The NAFLD activity score (NAS) and the fibrosis stage was assessed using the NAFLD scoring system for mice models validated by Liang et al. [23]. Briefly, steatosis was graded as follows: grade 0, b 5% of steatotic hepatocytes; grade 1, 5–33%; grade 2, N 33–66%; and grade 3, N 66%. Lobular inflammation was scored as follows: 0, no foci; 1, 0.5–1 foci; 2, 1–2 foci; and 3, N 2 foci. Ballooning was classified as 0, none; 1, few balloon cells; and 2, many balloon cells. In addition, fibrosis staging was defined as 0, none; 1, perisinusoidal and/or pericentral; 2, incomplete central/central bridging fibrosis; 3, complete central/central bridging fibrosis; and 4, definite cirrhosis. NAS was calculated for each liver biopsy based on the sum of scores for steatosis, inflammation and ballooning.

Quantitative analysis of collagen in Sirius Red-stained liver sections was performed using imaging analysis software (ImageJ software (<http://imagej.nih.gov>)). Briefly, paraffin sections of 20 μ m thickness were stained in 0.1% Sirius red in saturated picric acid. The red-stained area (μ m²) was measured in five consecutive fields (40 \times). Fibrotic area percentage was calculated relative to the total area examined.

2.4. Isolation and culture of hepatocytes

Hepatocytes were isolated from non-fasting male Wt and hCOX-2-Tg mice by perfusion through the inferior cava vein with Hank's balanced salt solution (HBSS) (Gibco), 1 mM HEPES pH 7.4, 0.2 mM EGTA and William's E medium (Sigma) with 0.8 mg/ml collagenase type 1 (Worthington, Biochemical Corporation, USA) [2]. After filtering through a cell strainer (100 μ m) and centrifugation at 70 g, 4 °C

for 5 min, cells were resuspended in the following attachment cultured medium: DMEM/F12, 20 mM HEPES pH 7.4, 0.05% NaHCO₃, 5 mM glucose, 10% FBS (Sigma), 5 mg/ml BSA, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 50 µg/ml gentamicin, and purified by density gradient centrifugation using an isotonic solution of Percoll (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Cells were plated in 6 multiwell dishes at a density of 500,000 cells/well in attachment cultured medium with 10% FBS. Cell viability was checked by Trypan blue exclusion. Cells were serum starved at 2% FBS for 4 h and further treated with 2 ng/ml TGF-β1, 5 µM PGE₂ or 5 µM DFU overnight.

2.5. Isolation of Kupffer cells

For Kupffer cells (KC) isolation, the supernatant from the first centrifugation of the hepatocyte isolation protocol was collected and centrifuged twice at 50 g for 5 min to discard the pellet with remaining hepatocytes, as described previously [24]. Briefly, the latest supernatant was centrifuged at 500 g for 5 min at 4 °C and the pellet containing the KC was resuspended in the attachment culture medium. Cells were mixed by inversion with 50% Percoll and centrifuged at 1059 g for 30 min without acceleration or brake at room temperature. Finally, KC pellet was washed with PBS, centrifuged twice at 500 g for 10 min at 4 °C to wash out the residual Percoll solution and cells were resuspended directly in TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for further mRNA analysis.

2.6. Isolation and culture of hepatic stellate cells (HSC)

The isolation of HSCs from mice livers was performed as described [25] and can be divided into: *In situ* pronase (0.4 mg/ml) in perfusion solution/collagenase (0.8 mg/ml, increasing 1.5-fold after CCl₄ treatment) in William's E medium of mouse liver; subsequent *in vitro* digestion; and density gradient-based separation of HSCs from other hepatic cell populations. Briefly, after the *in situ* digestion, the liver was carefully removed and minced under sterile conditions. The minced liver was further digested *in vitro* with pre-warmed pronase (0.4 mg/ml)/collagenase (0.8 mg/ml)/DNase I (0.1 mg/ml)/HEPES (10 mM) in HBSS pH 7.3 solution. Then, the liver cell suspension was filtered through a 100 µm cell strainer to eliminate undigested tissue remnants and centrifuged at 600 g for 10 min at 4 °C. The pellet of non-parenchymal cells was resuspended in GBSS (Sigma) and purified by density gradient centrifugation using 14% Nycodenz (Sigma). HSC cells were collected from the diffuse white interfase layer and centrifuged in PBS/03% BSA at 600 g for 5 min at 4 °C. Cells were resuspended directly in TRIzol reagent (Invitrogen) for further mRNA analysis or were plated in 12 multiwell dishes (Corning, New York, USA) with DMEM, 20% FBS and 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 50 µg/ml gentamicin. Cells were cultured by 0, 1 and 3 days.

2.7. Isolation of hepatic non-parenchymal cells (NPCs) for flow cytometry analysis

Hepatic non-parenchymal cells were isolated as described previously [26]. Briefly, liver tissue was excised in HBSS^{-/-} at RT, mashed through a cell strainer (100 µm), centrifuged at 500 g for 5 min at RT and the cell pellet resuspended in 36% Percoll-HBSS solution. After centrifugation at 800 g for 20 min without brake, erythrocyte lysis was performed for 10 min at RT in 139 mM NH₄Cl, 19 mM Tris-HCl pH 7.2 solution, washed the pellet twice, and resuspended in 100 µl of PBS.

2.8. Flow cytometry

NPC cells (0.3–0.5 × 10⁶ cells/test) were incubated for 20 min at RT in the dark with the following antibodies (5 µg/ml): CD11b-Mac1-PECy7 (rat IgG2bk, anti-mouse eBioscience, San Diego CA, USA),

CD45-FITC (rat IgG, Beckman), F4/80-PE (ratIgG2ak, eBioscience), Ly6C-FITC (rat IgMk, anti-mouse, Pharmingen, San José, CA, USA) and CCR2-APC (ratIgG2B, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) or their corresponding isotype controls. After three washes, Perfect-Count microspheres (Cytognos, Salamanca, Spain) were added to quantify the exact number of cells. Flow cytometry analysis was performed using Cytomics FC500 with the CXP program. In Supplementary Fig. 1 is shown the efficiency of isolation of immune cell population in RCD and MCD groups.

2.9. Hepatic stellate cell lines cultures

The LX-2 cell line, a spontaneously immortalized human hepatic stellate cell, was purchased from (Millipore, Billerica, MA, SCC064) and recently authenticated using Promega's StemElite™ ID System in the Genomics Core facility of the IIB. LX-2 cells were maintained in EmbryoMAX medium (Millipore, Billerica, MA, USA) supplemented with glutamine and 2% foetal bovine serum (Sigma). Cells were maintained in Dulbecco's culture medium (Gibco), supplemented with 5% FBS, in a humidified atmosphere with 5% CO₂. For the activation experiments, cells (4 × 10⁵/well) were seeded into six-well culture plates starving, treated with 5 µM PGE₂ overnight and then treated with 2 ng/ml TGF-β1 for 6 h.

2.10. Determination of metabolites, cytokines and hormones

PGE₂ was determined in liver tissue by specific immunoassay (Arbor Assays, Ann Arbor, MI, USA). Blood glucose levels were measured with an Accu-Check Glucometer (Roche). Serum ALT activity was determined using Reflotron strips (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain), accordingly with the manufacturer's instructions. Triglycerides, cholesterol and HDL were determined in plasma by enzymatic methods with specific kits from BioSystems (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany). Plasma cytokine levels were assessed by Luminex analysis (Luminex 100IS Multiparametric Analyzer). To quantify collagen, hepatic hydroxyproline content was assayed according to the manufacturer's instructions by a hydroxyproline kit (Hydroxyproline Assay Kit, Sigma). Caspase-3 and 8 activities were determined by Caspase-3/8 Fluorogenic Substrate (BD Pharmingen). The protease activity is represented by fluorescence arbitrary units. Protein levels were determined using the Bradford reagent (Bio-Rad) [27].

2.11. Measurement of intracellular redox state

The oxidation-sensitive fluorescent probes 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used *in vitro* to analyze the intracellular redox status [28]. After treatment and at the indicated times, cells were incubated with 5 µM H₂DCFDA (30 min, 37 °C), washed and lysed with a buffer containing: 25 mM HEPES pH 7.5, 60 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA and 0.1% Triton X-100 (10 min, 4 °C) and transferred in duplicate into 96-well plate. Fluorescence was measured in a Microplate Fluorescence Reader and corrected by protein content. Lipid peroxidation (LPO) levels were determined as indirect measurements of ROS production. The amount of aldehyde products generated by LPO was quantified *ex vivo* in liver tissue by the TBA reaction according to the method of Ohkawa et al. [29]. Liver tissue (30 mg) were homogenized with 300 µl of 0.15 M KCl and 50 µl of liver homogenate were incubated for 60 min at 95 °C with 0.3% TBA pH 3–3.5, 0.5% SDS and 7.5% acetic acid. The mixture was centrifuged at 4000 g for 10 min. The amount of TBA reactants (TBARS) was expressed in terms of MDA using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as a standard (nmol MDA/mg protein) [30]. Total (GSHt) and oxidized glutathione (GSSG) were determined in total liver homogenates according to the protocol described by Tietze [31] with slight modifications. Briefly, intracellular GSH and GSSG contents were determined according to

the glutathione reductase-DTNB recycling assay as described previously [32]. Liver lysate was subsequently precipitated by adding 5-sulfosalicylic acid (SSA) and removed by centrifugation. The resulting supernatant was collected and assayed for total GSH and GSSG. To determine GSSG level of the lysate, first, 2-vinylpyridine was added and kept at 37 °C for 1 h to derive GSH.

2.12. RNA isolation

Total RNA of liver and cell samples was extracted by using TRIzol reagent. Total RNA (1 µg) was reverse transcribed using a Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit following the manufacturer's indications (Roche).

2.13. Quantitative real-time PCR analysis

qPCR was performed with a MyiQ Real-Time PCR System (Bio-Rad) sequence detector using the SsoFast EvaGreen Polymerase method (Bio-Rad) and d(N)6 random hexamer with the primers described in Supplementary Table I. Specific primers were purchased from Invitrogen. PCR thermocycling parameters were 95 °C for 30 s, 40 cycles of 95 °C for 5 s, and 60 °C for 10 s. Each sample was run in triplicate and was normalized to 36b4 RNA. The replicates were then averaged, and fold induction was determined in a $\Delta\Delta C_t$ based fold-change calculations.

2.14. Western blot analysis

Extracts from tissue samples (50–100 mg) or cells ($2-3 \times 10^6$) were obtained as previously described [21]. Nuclear and cytosolic extracts were isolated from 100 mg of liver tissue with 0.3 M sucrose solution. The homogenate was centrifuged at 1000 g at 4 °C for 10 min to separate the cytosolic fraction (supernatant) and nuclear fraction (pellet). The supernatant was centrifuged 3 times at 18,600 g at 4 °C for 20 min, and collected in a new tube. The pellet was washed 4 times with 0.3 M sucrose solution, and centrifuged at 1000 g at 4 °C for 10 min. After, the pellet was resuspended in RIPA and shaken at 4 °C for 1 h. The nuclear extract was obtained through centrifugation at 8000 g at 4 °C for 15 min. Finally, the total protein was measured as previously described [21].

For Western blot analysis, whole-cell extracts were boiled for 5 min in Laemmli sample buffer, and equal amounts of protein (20–30 µg) were separated by 10–15% SDS-polyacrylamide electrophoresis gel (SDS-PAGE). The relative amounts of each protein were determined with the polyclonal or monoclonal antibodies described in Supplementary Table II. After incubation with the corresponding anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase conjugated secondary antibody, blots were developed by the ECL protocol (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA). Target protein band densities were normalized with GAPDH. The blots were revealed, and different exposition times were performed for each blot with a charged coupling device camera in a luminescent image analyzer (LAS 500, GE) to ensure the linearity of the band intensities. Densitometric analysis of the bands was carried out using ImageJ software (<http://imagej.nih.gov>) and expressed in arbitrary units.

2.15. Data analysis

Data are expressed as means \pm S.E. Statistical significance was estimated using Student 2-tailed *t*-test to evaluate the differences between treated and untreated mice within a single genotype and between genotypes. Analysis was performed by using the statistical software GraphPad Prism 5. A *p* < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Sustained liver COX-2 expression protects transgenic mice from MCD-induced hepatic steatosis and liver damage

The majority of current NASH mouse models do not fully recapitulate the human condition, however, the MCD diet model is characterized by the rapid appearance of steatosis in 2–4 weeks, inflammation and cell death, which represent the main features of steatohepatitis and replicates NASH histological phenotype [33]. The MCD diet model induces experimental NASH through the assessment of the inflammatory pathway and this model was used to study this stage of the disease [34]. We used our previously described transgenic mice (hCOX-2-Tg) that constitutively express human COX-2 in hepatocytes under the control of the human ApoE promoter and its specific hepatic control region (HCR). The expression of hCOX-2 is only achieved in the hepatocytes of hCOX-2-Tg mice, and is comparable to the physiologic levels reached in the regenerating liver after partial hepatectomy [3,5]. We found levels of PGE₂ N 3 fold higher in hCOX-2-Tg compared to Wt mice, even when there is a clear tendency to increase PGE₂ hepatic levels in Wt mice with the MCD diet (Fig. 1A–B). This increase is associated with an induction of endogenous COX-2 expression (data not shown). After 2 and 4 weeks of MCD diet, both Wt and hCOX-2-Tg mice showed a marked decrease in body weight (N 30%), and this fact cannot be associated with food intake differences (data not shown). Although no significant differences were found in weight loss between hCOX-2-Tg and Wt mice during the first 2 weeks, from the third week of treatment the decrease on body weight was significantly attenuated in hCOX-2-Tg (Fig. 1C). Administration of MCD diet resulted in a marked elevation of serum ALT, but it was significantly lower in hCOX-2-Tg mice (Fig. 2D). Plasma biochemistry is shown in Supplementary Table III.

To correlate the increase in ALT levels with the histological damage, liver sections were stained with hematoxylin/eosin (H&E) and Masson's trichrome (MTC) and then assessed by an experienced liver pathologist. The MCD diet induced a marked steatosis in both Wt and hCOX-2-Tg mice whereas the hepatic fat amount was significantly lower in hCOX-2-Tg mice at 4 weeks (Fig. 2A–B). A significant decrease in the inflammation and ballooning (a characteristic form of hepatocellular injury in steatohepatitis) scores was observed at 4 weeks in hCOX-2-Tg (Fig. 2C–D). No MTC staining was observed neither in Wt or hCOX-2-Tg liver after MCD. Likewise, NAFLD activity score was significantly lower in hCOX-2-Tg mice fed MCD diet during 4 weeks than in Wt litter-mates. To note, MCD-hCOX-2-Tg mice recover faster to pre-treatment situation after feeding a RCD diet. Body weight (Fig. 3A) recovery was significantly higher in hCOX-2-Tg. Similar results were obtained in plasma ALT levels (Fig. 3B) associated with a significant decrease in NAFLD activity score (Fig. 3C–D), showing not only that constitutive hepatic COX-2 expression attenuated the damage under MCD but also lead to a faster recuperation.

3.2. COX-2 expression reduced hepatic inflammation in a diet-induced NASH model

In NASH dietary model, steatosis and elevated serum ALT levels are followed by inflammation [35]. As is shown in Fig. 2C, MCD diet for 4 weeks induced moderate to severe lobular inflammation in Wt mice liver, whilst it was mild to moderate in hCOX-2-Tg mice. Our previous data [5,20] showed lower levels of inflammatory markers in hCOX-2-Tg mice after liver injury. After 4 weeks of MCD diet, the plasmatic levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α and MCP-1 were increased by MCD especially in Wt mice *vs.* hCOX-2-Tg counterparts (Fig. 4A). Chemokines play pivotal roles in the recruitment of immune cells at sites of inflammation [36]. To gain insight into the process, we isolated non-parenchymal cells (NPCs) from liver and analyzed the monocyte recruitment in mice fed the MCD diet for 4 weeks. Similar number of CD45⁺ cells (leukocyte common antigen) was detected in Wt and hCOX-2-Tg mice livers

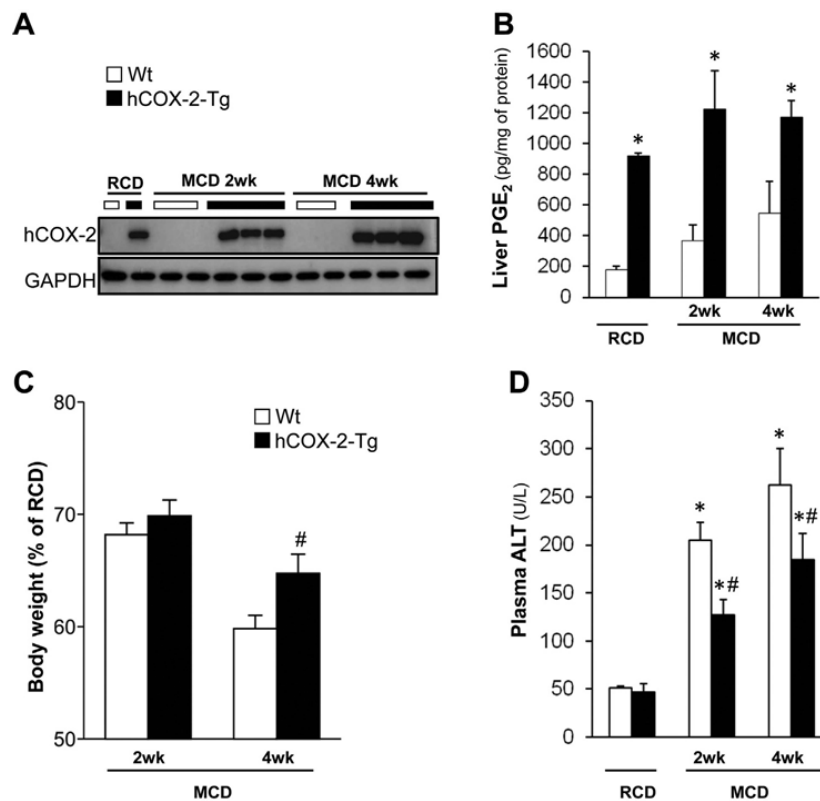


Fig. 1. hCOX-2-Tg mice are protected against MCD-induced liver damage. Wt and hCOX-2-Tg mice were fed MCD *ad libitum* for 2 and 4 weeks. (A) Human COX-2 protein was only detected in hCOX-2-Tg mice liver extracts and consistently, PGE₂ levels measured by EIA (B) were three fold higher vs. Wt mice. (C) Body weight of Wt and hCOX-2-Tg mice fed MCD expressed as percentage of basal body weight (D) Plasma levels of ALT in Wt and hCOX-2-Tg mice. Data are expressed as means \pm S.E. ($n = 5-6$ per group). * $p < 0.05$ vs. Wt-RCD; # $p < 0.05$ vs. Wt-MCD.

under RCD; but MCD diet produced a 5 fold increase in the number of CD45⁺ cells in the livers from Wt mice vs. a 3 fold increase in hCOX-2-Tg mice (Fig. 4B and Supplementary Fig. 1). Analysis of the hepatic recruited monocytes revealed that following MCD diet there was an increased number of F4/80⁺ CD11b⁺ cells (macrophages) in Wt livers (Fig. 4C), whereas there were no significant increase in the hCOX-2-Tg mice, showing an attenuated inflammatory response. As shown in Fig. 4D, when we analyzed MCP-1-associated macrophage recruitment by evaluating the CCR2 levels, the number of CCR2-expressing cells was higher in MCD diet fed Wt mice. Also the number of cells that express Ly6C (inflammatory monocytes), a marker for bone marrow (BM)-derived circulating peripheral blood monocytes [37], was significantly increased in the Wt-MCD livers, whereas this effect was attenuated in hCOX-2-Tg mice (Fig. 4E). These results agree with previous reports suggesting that infiltrated hepatic macrophages express CCR2 inflammatory phenotypes in diet-induced NASH model and HFD/obese mice [38,39]. Concordantly, in Fig. 4F and G we show that hepatic COX-2 expression attenuates MCD-induced increase of pro-inflammatory genes in total liver and specifically in isolated Kupffer cells, respectively.

3.3. Constitutive hepatocyte COX-2 expression leads to decreased apoptosis and oxidative stress

Previously, we reported that hepatocyte apoptosis was increased in NASH [9], and clearly established the anti-apoptotic role of hepatic COX-2 expression [21,40]. To further explore the protective effect of COX-2 expression, caspases activities and some key apoptotic/antiapoptotic protein levels were measured. As shown in Fig. 5A, both

caspase-3 and -8 activities increased only in MCD-Wt mice at 4 weeks. Consistent with this, an important increase in the Bax/Bcl-x_L ratio was found only in MCD-Wt mice. Even more, the attenuation found in hCOX-2-Tg mice livers could be explained in part by an increase in the anti-apoptotic protein Mcl-1 (Fig. 5B). Steatohepatitis is associated with the generation of reactive oxygen species and other oxidative stress-related compounds. Lipid peroxidation (LPO) was determined by the reaction of thiobarbituric acid (TBA) with malondialdehyde (MDA). LPO increased by MCD diet in both genotypes, but in a lesser extent in hCOX-2-Tg mice livers (Fig. 5C). The ratio of oxidized glutathione/total glutathione, evaluated as an intracellular redox status marker, was significantly higher only in Wt mice after 4 weeks of MCD diet (Fig. 5C). The products derived from lipid-peroxidation can mediate inflammatory recruitment by activating nuclear factor- κ B (NF- κ B). Also, it is known that NF- κ B is activated in MCD-diet-induced steatohepatitis occurring in both hepatocytes and non-parenchymal cell fraction [47, 41]. To know whether NF- κ B is involved in the regulation of inflammation in our model, nuclear p65 and cytosolic I κ B α protein levels were measured in Wt and hCOX-2-Tg liver after MCD. As shown in Fig. 5D, an important increase in nuclear p65 and phosphorylated cytosolic I κ B α protein levels indicating a NF- κ B pathway activation, was found in MCD-Wt mice whereas this activation was attenuated in MCD-hCOX-2-Tg mice.

3.4. PGE₂ protects isolated primary hepatocytes against TGF- β 1-dependent apoptosis and oxidative stress

It has been described that TGF- β 1 signaling in hepatocytes participates in steatohepatitis through regulation of cell death [42]. As

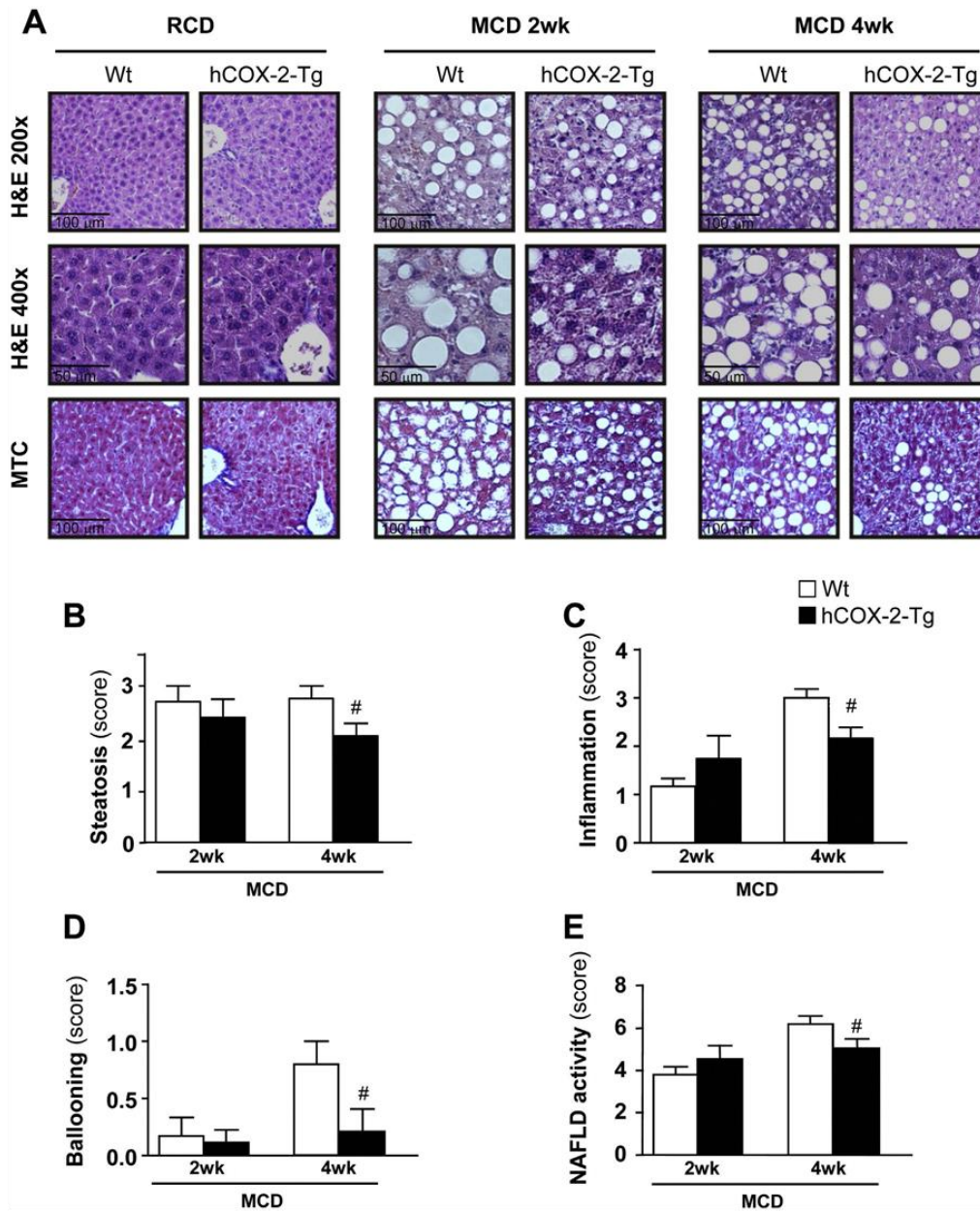


Fig. 2. COX-2 transgenic mice are protected against MCD-induced hepatic steatosis, inflammation and ballooning. (A) Representative images of hematoxylin/eosin (H&E) and Masson's trichromic (MTC) stained liver paraffin-embedded sections from Wt and hCOX-2-Tg mice fed RCD or MCD for 2 and 4 weeks. (B) Quantification of steatosis (C) Inflammation (D) Ballooning and (E) NAFLD activity score. Data are expressed as means \pm S.E. ($n = 5-6$ per group). [#] $p < 0.05$ vs. Wt-MCD 4 wk.

shown in Fig. 6A-C, TGF- β 1 induced caspase-3 activity and leads to increased Bax/Bcl- x_L ratio in isolated hepatocytes from Wt mice. However, TGF- β 1 did not induce apoptosis in hepatocytes from hCOX-2-Tg mice. Furthermore, when Wt hepatocytes were co-treated with TGF- β 1 and PGE $_2$ apoptosis was decreased and, conversely, when hCOX-2-Tg hepatocytes were treated with DFU, a COX-2 selective inhibitor; there was an increase in caspase-3 activity and in the Bax/Bcl- x_L ratio, indicating the specificity of COX-2-dependent prostaglandins in the

modulation of TGF- β 1-induced apoptosis. The oxidation-sensitive fluorescent probe DCFH was used to analyse the intracellular redox status. As shown in Fig. 6D, TGF- β 1 increased DCFH fluorescence only in Wt hepatocytes. PGE $_2$ treatment reversed this effect and pretreatment with DFU increased DCFH fluorescence in hCOX-2-Tg hepatocytes. Induction of mRNA levels of antioxidant genes such as *Cat*, cytosolic *Sod1*, mitochondrial *Sod2* and *Gis* (Supplementary Table IV) seems to mediate this effect in hCOX-2-Tg hepatocytes.

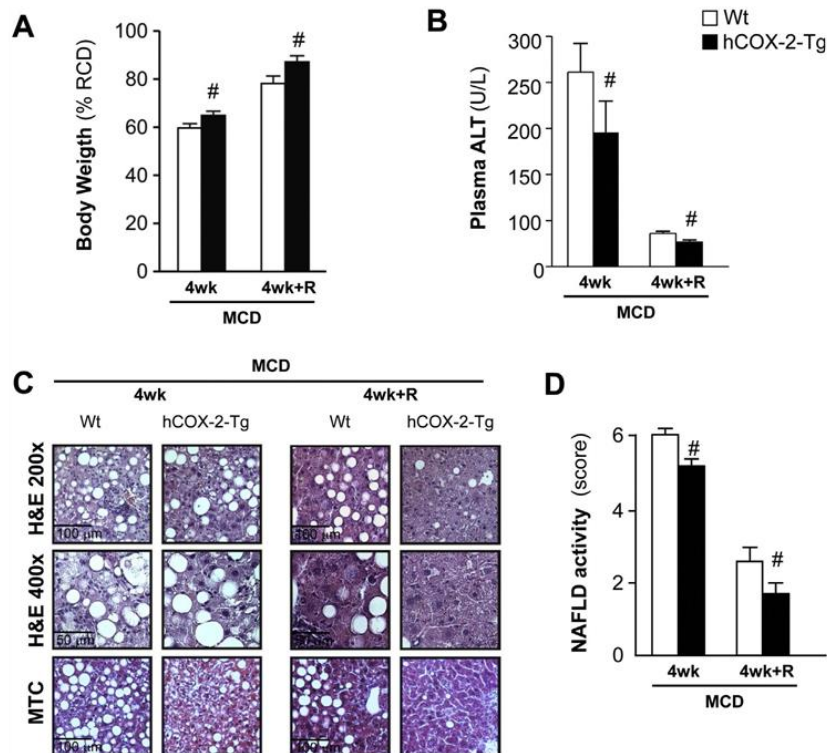


Fig. 3. MCD-COX-2-Tg mice recover to pre-treatment situation after feeding with RCD diet. Diet recovery models (group R-Wt and R-hCOX-2-Tg) were established by switching the Wt and hCOX-2-Tg mice fed a MCD for 4 weeks to the control, RCD, diet for 5 days. (A) Body weight of Wt and hCOX-2-Tg mice expressed as percentage of basal body weight. (B) Plasma levels of ALT in Wt and hCOX-2-Tg mice. (C) Representative images of stained with hematoxylin/eosin (H&E) and Masson's Trichrome (MTC) liver paraffin-embedded sections from Wt and hCOX-2-Tg mice. (D) Quantification of NAFLD activity score. Data are expressed as means \pm S.E. for 6 mice of each experimental group. # $p < 0.05$ vs. Wt-MCD or Wt-MCD+ R.

3.5. Hepatocyte COX-2 expression attenuates pro-fibrogenic markers in a CCl₄-induced liver fibrosis model

To investigate the role of hepatocyte COX-2 expression on fibrosis, we injected CCl₄ in Wt and hCOX-2-Tg mice twice a week for 9 weeks. Liver sections were stained with H&E, MTC and Picro Sirius Red to evaluate fibrosis stage and to quantify the size of the fibrotic area. We found a delayed progression in fibrosis stage in hCOX-2-Tg mice (Fig. 7A–B). It is known that TGF- β signaling in hepatocytes participates in steatohepatitis and fibrosis through regulation of cell death *via* phosphorylation and translocation of SMAD2/3 [42]. As shown in Fig. 7C and D, an important increase in phosphorylated SMAD2/3 was found in Wt mice after CCl₄ whereas the signaling was attenuated in hCOX-2-Tg mice. The reduced fibrosis seen in hCOX-2-Tg mice livers correlated with both a lower collagen 1a1 expression and hepatic hydroxyproline content (Fig. 7C and E). We next analyzed the activation of the pro-fibrogenic markers, desmin, α -SMA and vimentin and observed a significant decrease in all of them in hCOX-2-Tg mice *vs.* the Wt mice (Fig. 7C and F).

Concordantly, hepatic mRNA levels of *desmin*, *α -SMA* and *Colla1* were lower in hCOX-2-Tg livers after CCl₄ treatment (Supplementary Fig. 2). Also, hCOX-2-Tg livers showed lesser CCl₄-induced levels of PDGF-B and its receptor, known contributors to fibrogenesis [43]. In addition, COX-2 expression was able to induce mRNA expression of HGF, a potent suppressor of liver fibrosis [44] (Supplementary Fig. 2). In summary, hepatic expression of COX-2 attenuated the induction of fibrogenic markers in a CCl₄-induced liver injury model.

3.6. Prostanoids derived from COX-2 inhibit hepatic stellate cell activation both *in vivo* and *in vitro*

The reduced collagen deposition seen in hCOX-2-Tg mice livers after CCl₄ treatment prompted us to investigate a possible different activation of HSC cells in Wt and Tg mice in response to prostaglandins produced by hepatocytes (Hep), since hCOX-2 expression was only detectable in isolated Hep and not in HSC (Fig. 8A). mRNA expression level of *Colla1* and *α -SMA* in HSCs isolated from hCOX-2-Tg mice after 9 weeks of CCl₄ treatment showed lesser increase compared to Wt livers (Fig. 8B), suggesting that the hepatocyte expression of COX-2 prevents HSC activation *in vivo*. Then, we tested the specific role of PGE₂ on HSC activation *in vitro*, and found that *Colla1* and *α -SMA* levels in cell extracts from human HSC line (LX-2) induced by TGF- β 1 were reverted by the pre-treatment with PGE₂, pointing out its anti-fibrotic action (Fig. 8C). Even more, to determine the possible signaling pathways related with COX-2 and involved in *α -SMA* expression, LX-2 cells were treated with pharmacological inhibitors of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) (LY294002), protein kinase C (PKC) (Gö6983), PKA (4-cyano-3-methyl-isoquinoline, CMI), p38 mitogen-activated protein kinase (BRIB796), mitogen activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK/ERK) (PD98059), and NF- κ B (BAY11-7085), as well as antagonist of EP receptors. LX-2 cells express mRNAs of the four EP receptors (data not shown). As shown in Fig. 8D, most of the inhibitors reverse the decrease in *α -SMA* protein levels produced by PGE₂, implicating a complex process where PKC, PKA, p38, MEK/ERK and NF- κ B signaling pathways are involved.

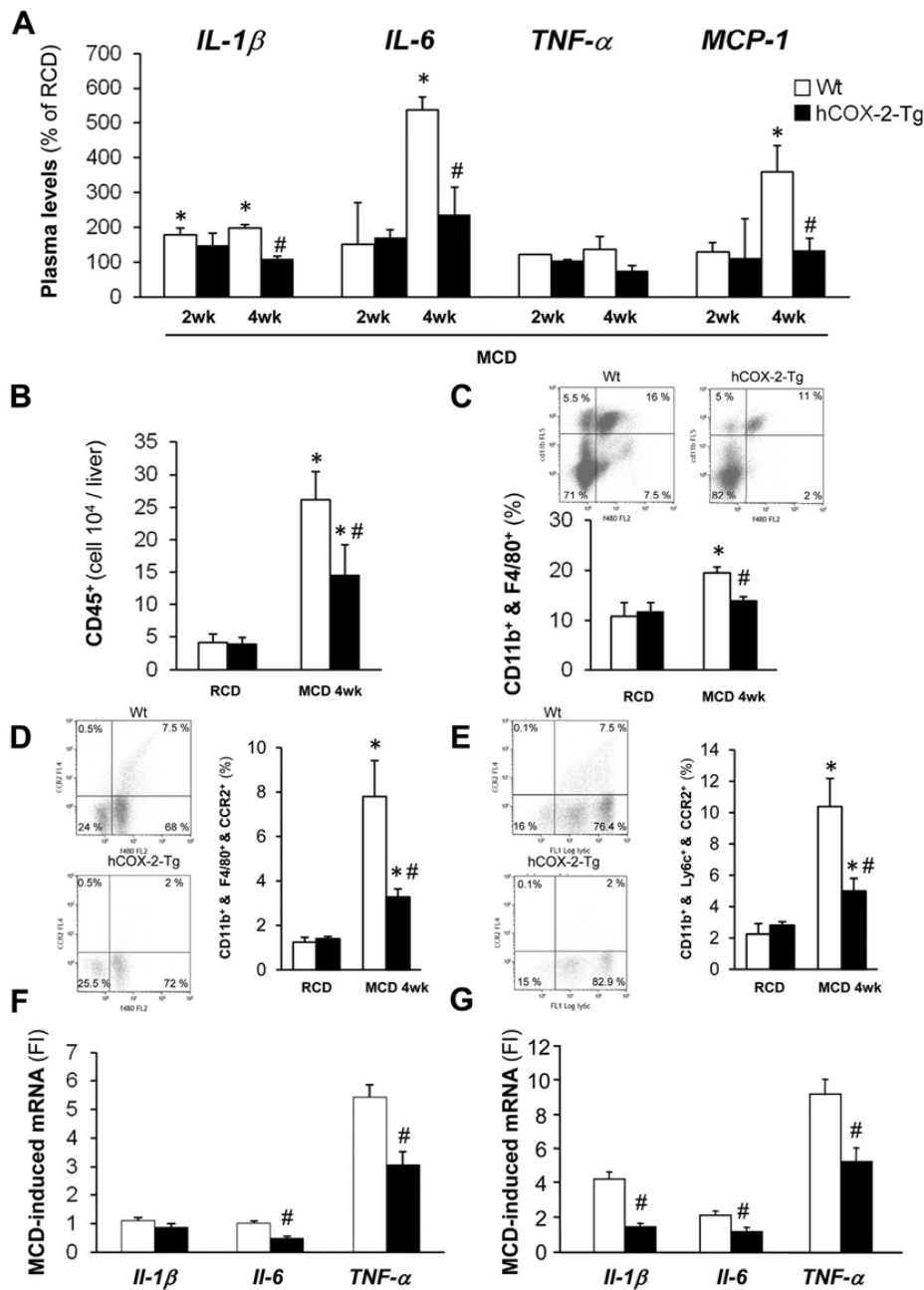


Fig. 4. Analysis of pro-inflammatory cytokines and hepatic macrophage recruitment in Wt and hCOX-2-Tg mice under MCD diet. (A) Plasmatic levels of IL-6, IL-1β, TNF-α and MCP-1 were assessed by Luminex analysis. Values are represented as fold increase relative to Wt-RCD. (B) Analysis of CD45⁺ isolated liver cells (C), F4/80⁺ and CD11b⁺ cells from the CD45⁺ gated cells in (B). (D) CCR2⁺ cells from F4/80⁺CD11b⁺ and (E) from CD11b⁺Ly6C⁺ cells. Data are expressed as means ± S.E. (n = 5–6 per group). *p < 0.05 vs. Wt-RCD; #p < 0.05 vs. Wt-4 wk MCD. mRNA MCD fold induced (FI) levels of pro-inflammatory markers in liver (F) and in isolated Kupffer cells (G). Data are expressed as means ± S.E. (n = 4 per group). #p < 0.05 vs. Wt-4 wk MCD.

Moreover, the data suggest that PGE₂ exerts its effects through EP2 and EP4 receptors (Fig. 8E).

4. Discussion

The impact of PGE₂ on the development of NASH and hepatic fibrosis is a matter of controversy. Some studies in animal models suggest that

COX-2-derived PGs favor the development of steatohepatitis and fibrosis in view of the beneficial effects after selective inhibitors (COXIBs) treatment [15,16], whilst others describe the opposite and provide evidence that PGE₂ suppresses fibrogenesis in HSC and the progression of steatohepatitis [14,18,19]. Even more, Yu et al. by using liver COX-2 transgenic mice, but in a different genetic background than ours, reported that COX-2 does not appear to mediate the development of liver

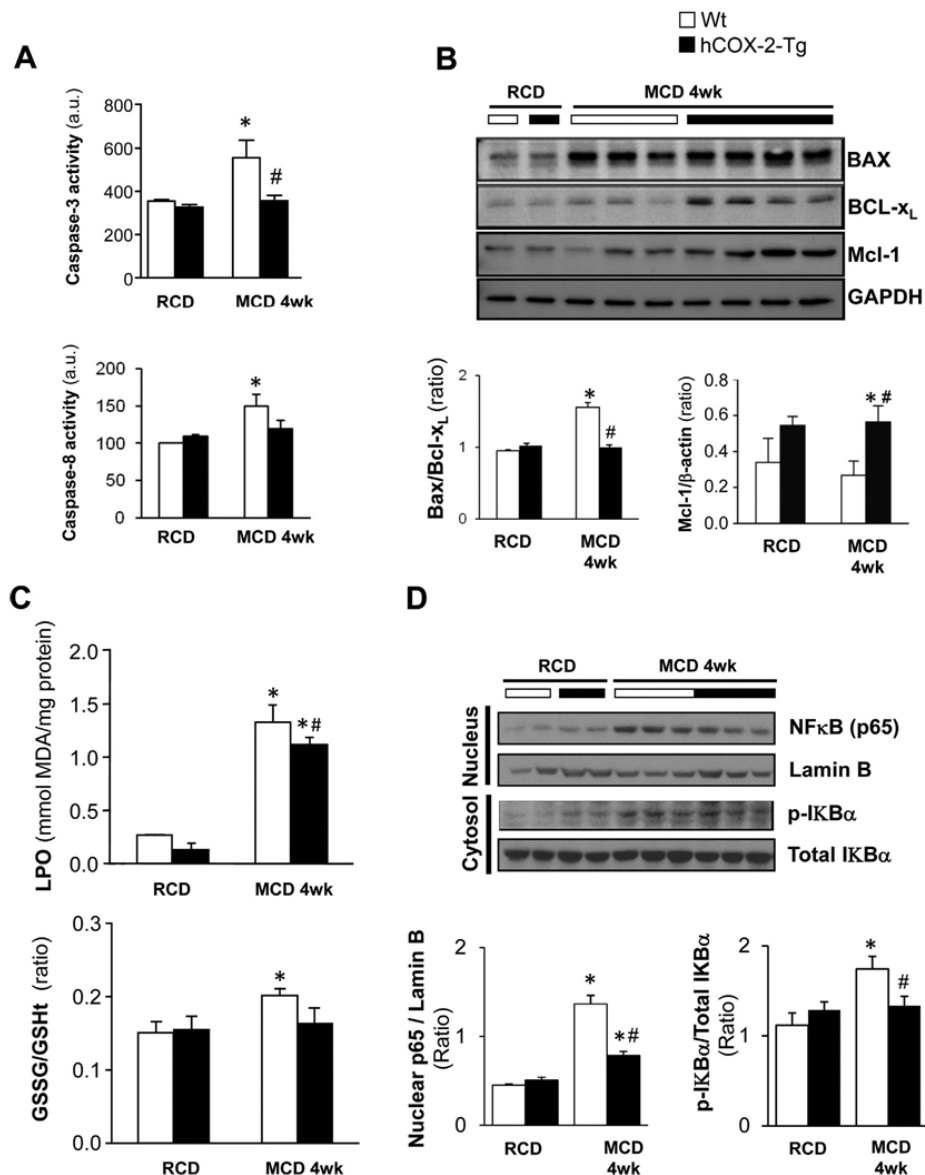


Fig. 5. COX-2 expression leads to decreased apoptosis and oxidative stress. (A) Caspase-3 and Caspase-8 activity in liver extracts from Wt and hCOX-2-Tg mice fed RCD and MCD for 4 weeks. (B) Representative Western blots and densitometric analysis of Bax, Bcl-x_L and Mcl-1 protein levels. (C) Lipid peroxidation determined by the reaction of thiobarbituric acid (TBA) with malondialdehyde (MDA) in liver homogenates and Oxidized glutathione/Total glutathione ratio (GSSG/GSHT) content. (D) Representative Western blots and densitometric analysis of p65 and phospho-IκBα protein levels that were analyzed in nuclear and cytosolic liver extracts respectively. Data are expressed as means ± S.E. (n = 4–5 per group). *p < 0.05 vs. Wt-RCD; #p < 0.05 vs. Wt-MCD.

fibrosis [45]. Our previous results indicate a protective role for COX-2 in liver injury by several insults [5,21,40] and pointed out COX-2 as a key player in the development of metabolic alterations [20,46]. It was reported that in mice fed the MCD diet, hepatic expression of COX-2 occurred paralleling the development of steatohepatitis [17]. To assess this induction as a possible physiologic early protective response to liver injury, we evaluated the role of sustained hepatic COX-2 expression in a murine model of dietary-induced steatohepatitis and hepatic fibrosis, resembling two different stages of NAFLD progression.

The MCD diet hallmarks include a rapid appearance of steatosis, inflammation and cell death [47]. Under these conditions COX-2

attenuated elevation of serum ALT which correlated to lower scores of key features of NASH on liver biopsies such as steatosis, inflammation and hepatocyte injury. Indeed, steatosis was significantly lower in hCOX-2-Tg mice, resembling the COX-2 anti-steatosis effect on a HFD model [20]. We used MCD dietary model to induce NASH and, after 4 weeks of MCD diet, Wt mice showed moderate to severe lobular inflammation, whilst in hCOX-2-Tg mice this was mild to moderate. Consistent with a previous report [5] constitutive hepatic expression of COX-2 leads to lower plasmatic levels of pro-inflammatory cytokines (*i.e.* IL-1β and IL-6 and MCP-1) after MCD. MCP-1 is a potent chemoattractant mediator, highly expressed in Kupffer cells, and its

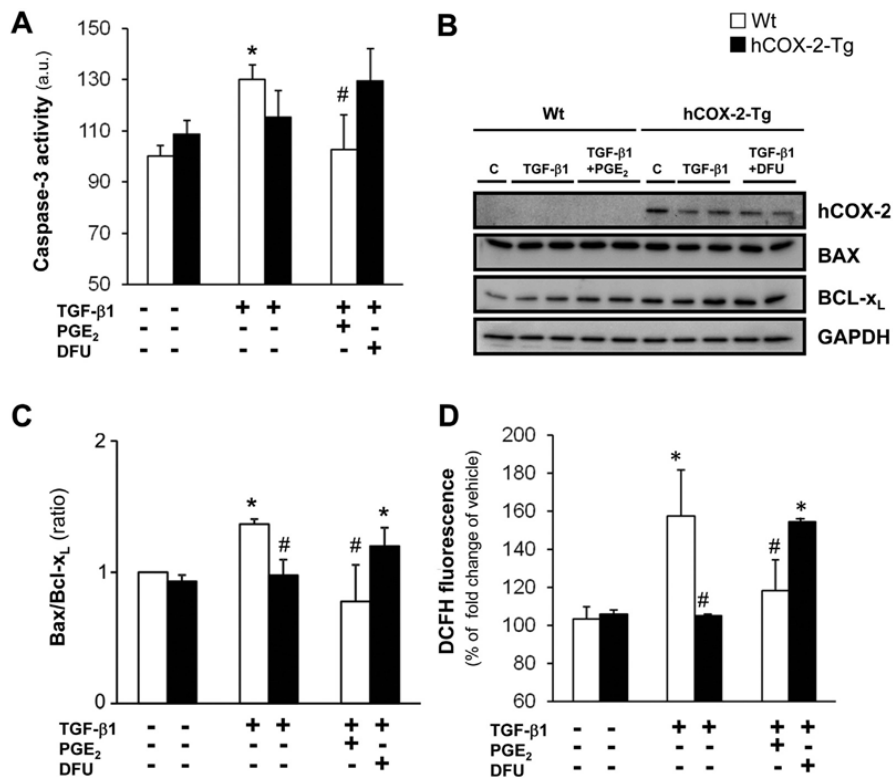


Fig. 6. PGE₂ protects isolated hepatocytes against TGFβ1-dependent apoptosis and oxidative stress. (A) Caspase-3 activity in isolated hepatocytes from Wt and hCOX-2-Tg mice after treatment with 5 μM PGE₂, 2 ng/ml TGFβ1 and 5 μM DFU overnight. (B) Representative Western blot and (C) densitometric analysis of the ratio Bax/Bcl-x_L, normalized against GAPDH of primary hepatocytes from Wt and hCOX-2-Tg livers. (D) Redox status estimated by DCFH fluorescence. Data for 3 independent experiments. **p* < 0.05 vs. Wt without treatment; #*p* < 0.05 vs. Wt-TGFβ1 condition.

receptor, the C\VC chemokine receptor type 2 (CCR2), is highly expressed in hepatic recruited macrophages compared to resident hepatic macrophages (KCs) [38,39]. Hepatic COX-2 derived PGE₂ could modulate MCP-1 release, as it has proved to be the case in human pulmonary fibroblasts [48]. Recent studies demonstrated that the recruited macrophages predominantly express CCR2 and this inflammatory phenotype promoted liver steatosis and fibrosis [49,50]. Our data also demonstrate a protective effect of continuously hepatic PGE₂ production on the total number of hepatic leukocytes (CD45⁺). In this regard, as previously reported [38], we found a diet-induced rise in infiltrated hepatic macrophages with inflammatory phenotypes (Ly6C⁺ CCR2⁺) in Wt mice but, interestingly, hCOX-2-Tg livers presented an attenuated inflammatory response, including Kupffer cells, with lower levels of pro-inflammatory markers leading to a diminished liver injury. In a recent report, it was suggested a prominent role for hepatocyte caspase-3 activation in NASH-related apoptosis and fibrogenesis that was in part mediated *via* CCR2-dependent infiltration of Ly6C⁺ macrophages [51]. In this regard, the role of COX-2 dependent PGs by modulating caspase-3 activity is well documented [5,40,52]. Our *in vivo* data support an attenuated inflammatory response, at least in part, by decreasing NF-κB activation derived from MCD diet, an anti-apoptotic effect of COX-2 in the NASH model and an improved antioxidant response to oxidative stress induced by MCD diet.

It is known that TGF-β signaling in hepatocytes promotes steatohepatitis *via* regulation of cell death and lipid metabolism. TGF-β signaling in hepatocytes induces hepatic steatosis, cell damage, inflammatory cell infiltration and fibrosis through Smad activation and ROS production, all conditions contributing to NASH [42]. In agreement

with previous data [53], our *in vitro* results by treating Wt and hCOX-2-Tg hepatocytes with TGF-β1 indicate that PGE₂ protects isolated hepatocytes against TGF-β-dependent apoptosis and oxidative stress as deduced by the important decrease of caspase-3 activation and ROS production.

Hepatic fibrosis is the wound-healing response of the liver entailing major alterations in the composition and quantity of the extracellular matrix (ECM). Hepatic stellate cells (HSC) are the key matrix-producing cells in liver and play a central role in hepatic fibrogenesis. Interestingly enough, hepatocyte COX-2 expression delayed fibrosis progression through a decrease in SMAD signaling and significantly decreased the fibrotic area in part by a lesser activation of HSC. These observations are in agreement with previously reported antifibrotic effects of COX-2-derived prostanoids [14,15,54]. Also, the beneficial effects of prostaglandins could be mediated by the induction of anti-fibrotic (HGF) [44] and by down-regulation of pro-fibrotic (PGDFB family members) factors [43]. In this regard, the lesser ECM deposition after CCl₄ treatment found in hCOX-2-Tg livers coincided with diminished HSC activation markers (*i.e.* α-SMA). Indeed, hepatic COX-2 expression prevents HSC activation *in vivo*. Moreover, *in vitro* treatment with PGE₂ counteracts the activation observed in LX-2 human HSC line by TGFβ1, in agreement with previous reports [14,19]. Recently, it was described that in the fibroblast to myofibroblast differentiation process elicited by TGF-β1, PGE₂ was able to reverse the expression of 62% of up-regulated and 50% of the down-regulated genes modulated by TGF-β1, pointing out an anti-TGF-β1 action by PGE₂ [55]. Regarding the mechanism by which PGE₂ mediated the attenuation of matrix production by HSC, there are various signaling pathways implicated as well as different

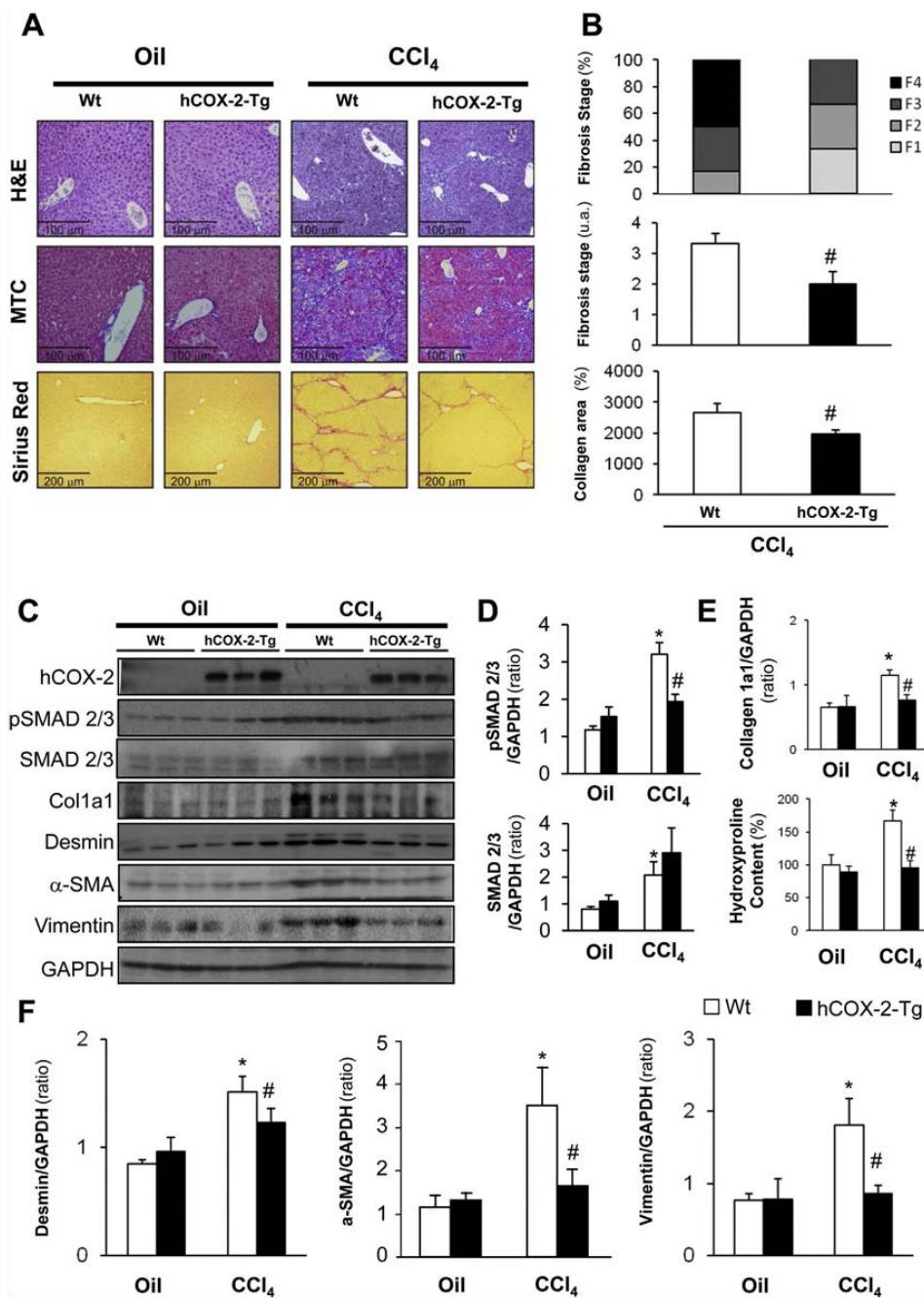


Fig. 7. Hepatocyte COX-2 expression attenuate pro-fibrogenic markers in a chronic CCl₄-induced liver injury model. (A) Representative images of hematoxylin/eosin(H&E), Masson's trichromatic (MTC) and Picro-Sirius Red stained liver paraffin-embedded sections from Wt and hCOX-2-Tg mice after 9 weeks of CCl₄ treatment. (B) Quantification of fibrosis stage and collagen area. (C) Representative Western blot and densitometric analysis of (D) phospho-SMAD2/3 and total SMAD2/3, (E) collagen 1a1 and hepatic hydroxyproline content, (F) desmin, α-SMA and vimentin. Data are expressed as means ± S.E. (n = 6–8 per group). *p < 0.05 vs. Wt-Oil; #p < 0.05 vs. Wt-CCl₄.

EP receptors. In agreement with previous data, PGE₂ inhibits α-SMA transcription through EP2/cAMP/PKA signaling in human lung fibroblasts [56]. Moreover, PGE₂ exerts a suppressive effect on fibrogenesis in pancreatic stellate cells *via* the cAMP pathway and suggest a role of EP2 and EP4 receptors [57]. Our data suggest that PGE₂ exerts its effects through EP2 and EP4 receptors in human LX-2 cells.

As pro-inflammatory mediator, PGE₂ is involved in the pathogenesis of several diseases; since COX inhibitors seem to be effective in reducing some deleterious effects. Accordingly, different *in vivo* models of liver fibrosis [15,16] reported beneficial effects of COXIBs, such as celecoxib. Opposite to this, pro-fibrogenic properties of celecoxib have been reported, worsening the fibrotic process with more HSCs activation [18].

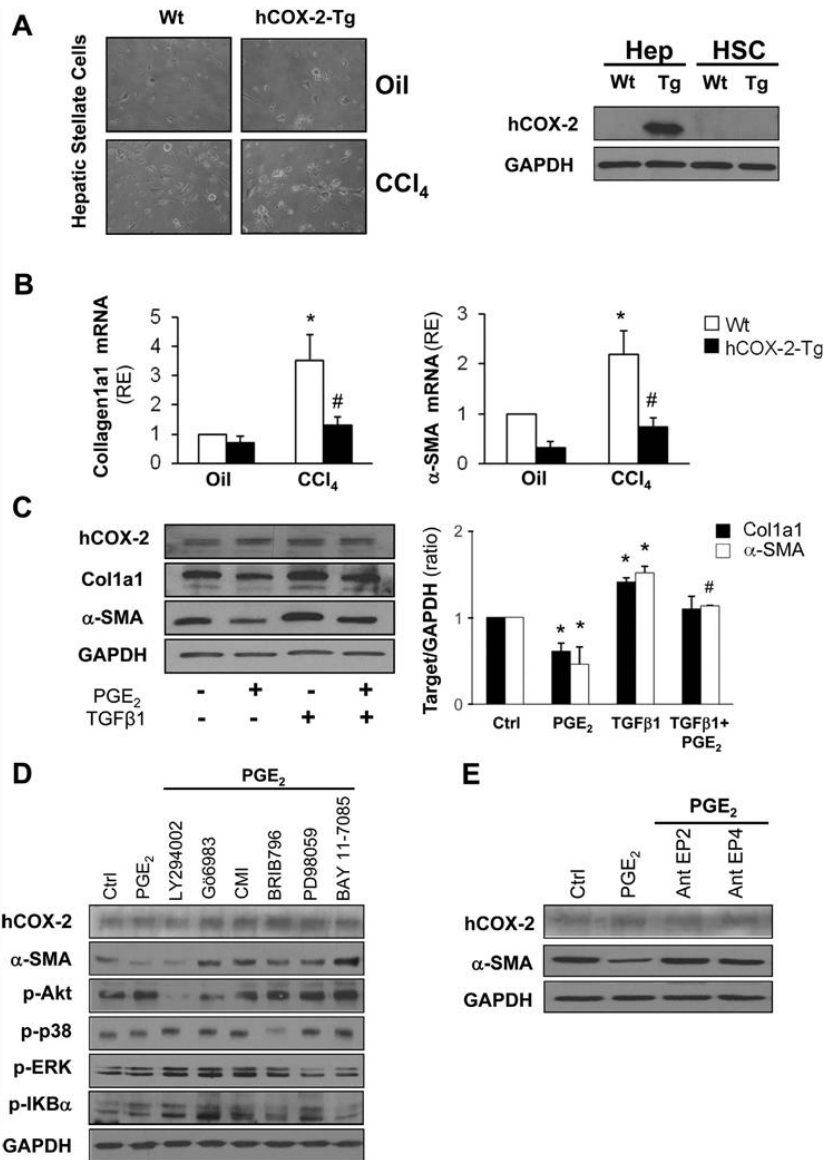


Fig. 8. Hepatic COX-2 expression prevents HSC activation. Role of PGE₂ *in vitro*. (A) Microphotography of 3 days cultured HSCs isolated from Wt and hCOX-2-Tg mice after 9 weeks of CCl₄ treatment. hCOX-2 protein levels in hepatocytes (Hep) and HSC cells from Wt and hCOX-2-Tg mice (B) mRNA expression of *Col1a1* and α -SMA in HSCs. Data are expressed as means \pm S.E. for 10–12 mice of each experimental group. **p* b 0.05 vs. Wt-Oil; #*p* b 0.05 vs. Wt-CCl₄ (C) Representative Western blot and densitometric analysis of *Col1a1* and α -SMA/GAPDH ratios in cell extract from human LX-2 cell line treated with 5 μ M PGE₂ overnight and/or 2 ng/ml TGF- β 1 for 6 h. (D) LX-2 cells were serum starved for 6 h prior to treatment with 5 μ M PGE₂ and different pharmacological inhibitors for 12 h (20 μ M LY294002, 1 μ M G66983, 0.4 μ M CMI, 0.5 μ M BRIB796, 50 μ M PD98059, and 10 μ M BAY11-7085) and EP receptor antagonist (1 μ M Ant EP2 (TG4-155) and 25 μ M Ant EP4 (GW627368X)). Protein levels were analyzed by Western blot. Data for 3 independent experiments. **p* b 0.05 vs. Ctrl; #*p* b 0.05 vs. TGF- β 1.

Again, controversy exists since the *in vitro* effects of celecoxib appear to be COX-2-independent [58]. Specifically, it has been demonstrated that celecoxib induces apoptosis of human and rat-derived HSCs [16] but, interestingly, other COXIBs, such as NS-398 or DFLU had no effect on cell viability, being DFLU a more selective inhibitor [59] and indicating that the protective role of celecoxib in hepatic fibrosis is not associated with COX-2 inhibition. In line with this, OSU-03012, a non-cyclooxygenase-inhibiting celecoxib derivative, promotes apoptosis and inhibits activation of LX-2 cells [60]. The deleterious effects of COX-2 inhibition on fibrosis progression were also reported in kidney [61] and lung [62]. The antifibrotic role of PGE₂ on pulmonary fibrosis is achieved by inhibiting

fibroblast proliferation, synthesis of collagen and modulation of TGF- β -induced transition of fibroblasts to myofibroblasts [63]. To note, PGE₂ in lungs is normally present at much higher concentrations than in plasma, resembling the levels of constitutive COX-2 expression reached in hCOX-2-Tg animals. In line with this, it has been reported that PGE₂ down-regulated the expression of fibrosis-inducing genes in human fat explants from obese individuals as well as the fibrogenic response of differentiated adipocytes to the fibrogenic actions of TGF- β [64]. In the presence of COX-2, the protective effect is afforded in at least two ways: through the production of hepatoprotective prostaglandins [3] promoting tissue regeneration [65] and by downregulation of pro-

inflammatory cytokines which help tissue recovery by promoting resolution of inflammation [66].

These results shed new insights into a possible physiological protective mechanism of COX-2 induction in the progression of the NAFLD pathogenesis. This hypothesis is sustained in the fact that using hCOX-2-Tg mice we confirmed that continuously derived hepatic PGE₂ production plays a protective role against the development of NASH and hepatic fibrosis. Thus, our data suggest that the use of stable PG analogs or mimicking COX-2 signaling in the liver could represent a good therapeutic option to ameliorate NAFLD progression.

4.1. Conclusions

In our transgenic mouse model, we corroborated that constitutive hepatocyte COX-2 expression ameliorates NASH and liver fibrosis development by reducing inflammation, oxidative stress and apoptosis and by modulating activation of hepatic stellate cells, respectively. This data suggest a possible protective role for COX-2 induction in NASH/NAFLD progression.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.06.009>.

Conflict of interest

The authors do not have any disclosures to report.

Funding

This work was supported by Financing Program for short stays abroad for Assistant Researchers (CONICET-Argentina) (2618/13) and ANPCyT-PICT 2383-2012 to DF.; SAF2012-39732 (MINECO, Spain) and CIBERhd (ISCIII, Spain) (CB06/04/1069) to M.C.; SAF2014-52492 (MINECO, Spain) to L.B.; S2010/BMD-2378 (Comunidad de Madrid, CAM) to L.B. and P.M.S.; RD12/0042/0019 (ISCIII, Spain) and CIBERhd (ISCIII, Spain) to L.B. and P.M.S.; SAF-2015-65267-R (MINECO/FEDER), S2010/BMD-2423 (Comunidad de Madrid, CAM), EFSO and Amylin Paul Langerhans Grant and CIBERdem (ISCIII, Spain) to A.M.V.; PI13/01299 (ISCIII, Spain) to C.G.M.; SAF2013-43713-R (MINECO, Spain) to P.M.S.

Transparency document

The [Transparency document](#) associated with this article can be found, in the online version.

References

- E. Ricciotti, G.A. FitzGerald, Prostaglandins and inflammation, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (2011) 986–1000, <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>.
- P. Martin-Sanz, N.A. Callejas, M. Casado, M.J. Diaz-Guerra, L. Boscá, Expression of cyclooxygenase-2 in foetal rat hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide and pro-inflammatory cytokines, *Br. J. Pharmacol.* 125 (1998) 1313–1319, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0702196>.
- M. Casado, N.A. Callejas, J. Rodrigo, X. Zhao, S.K. Dey, L. Boscá, et al., Contribution of cyclooxygenase 2 to liver regeneration after partial hepatectomy, *FASEB J.* 15 (2001) 2016–2018, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.01-0159je>.
- A. Fernández-Alvarez, C. Llorente-Izquierdo, R. Mayoral, N. Agra, L. Boscá, M. Casado, et al., Evaluation of epigenetic modulation of cyclooxygenase-2 as a prognostic marker for hepatocellular carcinoma, *Oncogenesis* 1 (2012), e23 <http://dx.doi.org/10.1038/oncsis.2012.23>.
- R. Mayoral, B. Mollá, J.M. Flores, L. Boscá, M. Casado, P. Martin-Sanz, Constitutive expression of cyclooxygenase 2 transgene in hepatocytes protects against liver injury, *Biochem. J.* 416 (2008) 337–346, <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20081224>.
- C.P. Day, Non-alcoholic fatty liver disease: a massive problem, *Clin. Med.* 11 (2011) 176–178.
- M. Masarone, A. Federico, I. Abenavoli, C. Loguercio, M. Persico, Non alcoholic fatty liver: epidemiology and natural history, *Rev. Recent Clin. Trials* 9 (2014) 126–133.
- F. Marra, A. Gastaldello, G. Sveglia, Baroni, G. Tell, C. Tiribelli, Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis, *Trends Mol. Med.* 14 (2008) 72–81, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2007.12.003>.
- C. Garcia-Monzón, O. Lo Iacono, R. Mayoral, A. González-Rodríguez, M.E. Miquilena-Colina, T. Lozano-Rodríguez, et al., Hepatic insulin resistance is associated with increased apoptosis and fibrogenesis in nonalcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C, *J. Hepatol.* 54 (2011) 142–152, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2010.06.021>.
- M. Asrih, F.R. Jornayvaz, Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance, *J. Endocrinol.* 218 (2013) R25–R36, <http://dx.doi.org/10.1530/OE-13-0201>.
- S.L. Friedman, Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 125–172, <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00013.2007>.
- S.L. Friedman, Mechanisms of hepatic fibrogenesis, *Gastroenterology* 134 (2008) 1655–1669, <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.003>.
- A. Castilla, J. Prieto, N. Fausto, Transforming growth factors beta 1 and alpha in chronic liver disease. Effects of interferon alfa therapy, *N. Engl. J. Med.* 324 (1991) 933–940, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199104043241401>.
- A.Y. Hui, A.J. Dannenberg, J.J.Y. Sung, K. Subbaramaiah, B. Du, P. Olinga, et al., Prostaglandin E2 inhibits transforming growth factor beta 1-mediated induction of collagen alpha 1(I) in hepatic stellate cells, *J. Hepatol.* 41 (2004) 251–258, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2004.04.033>.
- S.M. Kim, K.C. Park, H.G. Kim, S.J. Han, Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor meloxicam on liver fibrosis in rats with ligated common bile ducts, *Hepatol. Res.* 38 (2008) 800–809, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1872-034X.2008.00339.x>.
- Y.-H. Paik, J.K. Kim, J.I. Lee, S.H. Kang, D.Y. Kim, S.H. An, et al., Celecoxib induces hepatic stellate cell apoptosis through inhibition of Akt activation and suppresses hepatic fibrosis in rats, *Gut* 58 (2009) 1517–1527, <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2008.157420>.
- J. Yu, E. Ip, A. Dela Peña, J.Y. Hou, J. Sessa, N. Pera, et al., COX-2 induction in mice with experimental nutritional steatohepatitis: role as pro-inflammatory mediator, *Hepatology* 43 (2006) 826–836, <http://dx.doi.org/10.1002/hep.21108>.
- A.Y. Hui, W.K. Leung, H.L.Y. Chan, F.K.L. Chan, M.Y.Y. Go, K.K. Chan, et al., Effect of celecoxib on experimental liver fibrosis in rat, *Liver Int.* 26 (2006) 125–136, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1478-3231.2005.01202.x>.
- Y. Kanada, K. Mori, H. Matsumoto, S. Kiso, Y. Yoshida, S. Shinzaki, et al., N-Acetylglucosaminyltransferase V regulates TGF-β response in hepatic stellate cells and the progression of steatohepatitis, *Glycobiology* 22 (2012) 778–787, <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwr012>.
- D.E. Francés, O. Motiño, N. Agra, A. González-Rodríguez, A. Fernández-Alvarez, C. Cucarella, et al., Hepatic cyclooxygenase-2 expression protects against diet-induced steatosis, obesity and insulin resistance, *Diabetes* 64 (2015) 1522–1531, <http://dx.doi.org/10.2337/db14-0979>.
- M. Casado, B. Mollá, R. Roy, A. Fernández-Martínez, C. Cucarella, R. Mayoral, et al., Protection against Fas-induced liver apoptosis in transgenic mice expressing cyclooxygenase 2 in hepatocytes, *Hepatology* 45 (2007) 631–638, <http://dx.doi.org/10.1002/hep.21556>.
- V.G. Trusca, E.V. Fuior, I.C. Florea, D. Kardassi, M. Simionescu, A.V. Gafencu, Macrophage-specific up-regulation of apolipoprotein E gene expression by STAT1 is achieved via long range genomic interactions, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 13891–13904, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.179572>.
- W. Liang, A.L. Menke, A. Driessen, G.H. Koek, J.H. Lindeman, R. Stoop, et al., Establishment of a general NAFLD scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology, *PLoS One* 9 (2014), e115922 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0115922>.
- V. Pardo, A. González-Rodríguez, C. Guijas, J. Balsinde, A.M. Valverde, Opposite cross-talk by oleate and palmitate on insulin signaling in hepatocytes through macrophage activation, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 11663–11677, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115.649483>.
- I. Mederacke, D.H. Dapito, S. Afif, H. Uchinani, R.F. Schwabe, High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers, *Nat. Protoc.* 10 (2015) 305–315, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015.017>.
- C. Sanz-García, G. Ferrer-Mayorga, A. González-Rodríguez, A.M. Valverde, A. Martín-Duce, J.P. Velasco-Martín, et al., Sterile inflammation in acetaminophen-induced liver injury is mediated by Cot/tpl2, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 15342–15351, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.439547>.
- M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- D. Francés, M.T. Ronco, E. Ochoa, M.L. Alvarez, A. Quiroga, J.P. Parody, et al., Oxidative stress in primary culture hepatocytes isolated from partially hepatectomized rats, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 85 (2007) 1047–1051, <http://dx.doi.org/10.1139/y07-087>.
- H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* 95 (1979) 351–358.
- D.E. Francés, M.T. Ronco, P.I. Ingarano, J.A. Monti, G.B. Pisani, J.P. Parody, et al., Role of reactive oxygen species in the early stages of liver regeneration in streptozotocin-induced diabetic rats, *Free Radic. Res.* 45 (2011) 1143–1153, <http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2011.602345>.
- F. Tietze, Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues, *Anal. Biochem.* 27 (1969) 502–522.
- C. Vandeputte, I. Guizon, I. Genestie-Denis, B. Vannier, G. Lorenzon, A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/ isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol, *Cell Biol. Toxicol.* 10 (1994) 415–421.
- S.H. Ibrahim, P. Hirsova, H. Malhi, G.J. Gores, Animal models of nonalcoholic steatohepatitis: eat, delete, and inflame, *Dig. Dis. Sci.* (2015) <http://dx.doi.org/10.1007/s10620-015-3977-1>.
- E. Mas, M. Danjoux, V. Garcia, S. Carpentier, B. Séguin, T. LeVade, Il-6 deficiency attenuates murine diet-induced non-alcoholic steatohepatitis, *PLoS One* 4 (2009), e7929 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007929>.

- 35 M.E. Rinella, M.S. Elias, R.R. Smolak, T. Fu, J. Borensztajn, R.M. Green, Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet, *J. Lipid Res.* 49 (2008) 1068–1076, <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M800042-JLR200>.
- 36 C. Baeck, A. Wehr, K.R. Karimark, F. Heymann, M. Vucur, N. Gassler, et al., Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury, *Gut* 61 (2012) 416–426, <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300304>.
- 37 K.R. Karimark, R. Weiskirchen, H.W. Zimmermann, N. Gassler, F. Günhou, C. Weber, et al., Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis, *Hepatology* 50 (2009) 261–274, <http://dx.doi.org/10.1002/hep.22950>.
- 38 K. Miura, L. Yang, N. van Rooijen, H. Ohnishi, E. Seki, Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 302 (2012) G1310–G1321, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00365.2011>.
- 39 H. Morinaga, R. Mayoral, J. Heinrichsdoiff, O. Osborn, N. Franck, N. Hah, et al., Characterization of distinct subpopulations of hepatic macrophages in HFD/obese mice, *Diabetes* 64 (2015) 1120–1130, <http://dx.doi.org/10.2337/db14-1238>.
- 40 D.E.A. Francés, P.I. Ingarano, R. Mayoral, P. Través, M. Casado, A.M. Valverde, et al., Cyclooxygenase-2 over-expression inhibits liver apoptosis induced by hyperglycemia, *J. Cell. Biochem.* 114 (2013) 669–680, <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.24409>.
- 41 I.A. Leclercq, G.C. Farrell, C. Sempoux, A. dela Peña, Y. Horsmans, Curcumin inhibits NF-kappaB activation and reduces the severity of experimental steatohepatitis in mice, *J. Hepatol.* 41 (2004) 926–934, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2004.08.010>.
- 42 L. Yang, Y.S. Roh, J. Song, B. Zhang, C. Liu, R. Loomba, et al., Transforming growth factor beta signaling in hepatocytes participates in steatohepatitis through regulation of cell death and lipid metabolism in mice, *Hepatology* 59 (2014) 483–495, <http://dx.doi.org/10.1002/hep.26698>.
- 43 J.C. Bonner, Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases, *Cytokine Growth Factor Rev.* 15 (2004) 255–273, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.006>.
- 44 Q. Xu, M. Nakayama, Y. Suzuki, K. Sakai, T. Nakanura, Y. Sakai, et al., Suppression of acute hepatic injury by a synthetic prostacyclin agonist through hepatocyte growth factor expression, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 302 (2012) G420–G429, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00216.2011>.
- 45 J. Yu, C.W. Wu, E.S.H. Chu, A.Y. Hui, A.S.L. Cheng, M.Y.Y. Go, et al., Elucidation of the role of COX-2 in liver fibrogenesis using transgenic mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372 (2008) 571–577, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.05.069>.
- 46 O. Motilón, D.E. Francés, R. Mayoral, L. Castro-Sánchez, M. Fernández-Velasco, L. Boscá, et al., Regulation of MicroRNA 183 by cyclooxygenase 2 in liver is DEAD-box helicase p68 (DDX5) dependent: role in insulin signaling, *Mol. Cell. Biol.* 35 (2015) 2554–2567, <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00198-15>.
- 47 Y. Takahashi, Y. Soejima, T. Fukusato, Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis, *World J. Gastroenterol.* 18 (2012) 2300–2308, <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v18.i19.2300>.
- 48 M.W. Rolfe, S.L. Kunkel, T.J. Standiford, M.B. Orringer, S.H. Phan, H.L. Evanoff, et al., Expression and regulation of human pulmonary fibroblast-derived monocyte chemoattractant peptide-1, *Am. J. Physiol.* 263 (1992) L536–L545.
- 49 C. Mitchell, D. Couton, J.-P. Couty, M. Anson, A.-M. Crain, V. Bizet, et al., Dual role of CCR2 in the constitution and the resolution of liver fibrosis in mice, *Am. J. Pathol.* 174 (2009) 1766–1775, <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2009.080632>.
- 50 A.E. Ostfeld, E. Sugaru, M. Thearle, A.-M. Francisco, C. Gayet, H.N. Ginsberg, et al., C-C chemokine receptor 2 (CCR2) regulates the hepatic recruitment of myeloid cells that promote obesity-induced hepatic steatosis, *Diabetes* 59 (2010) 916–925, <http://dx.doi.org/10.2337/db09-1403>.
- 51 S. Thapaliya, A. Wree, D. Povero, M.E. Inzaugarat, M. Berk, L. Dixon, et al., Caspase 3 inactivation protects against hepatic cell death and ameliorates fibrogenesis in a diet-induced NASH model, *Dig. Dis. Sci.* 59 (2014) 1197–1206, <http://dx.doi.org/10.1007/s10620-014-3167-6>.
- 52 A. Fernández-Martínez, B. Mollá, R. Mayoral, L. Boscá, M. Casado, P. Martín-Sanz, Cyclooxygenase 2 expression impairs serum-withdrawal-induced apoptosis in liver cells, *Biochem. J.* 398 (2006) 371–380, <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20060780>.
- 53 B. Kroll, S. Kunz, N. Tu, L.R. Schwarz, Inhibition of transforming growth factor-beta1 and UV light-induced apoptosis by prostanoids in primary cultures of rat hepatocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 152 (1998) 240–250, <http://dx.doi.org/10.1006/taap.1998.8513>.
- 54 D.W. Beno, R. Espinal, B.M. Edelstein, B.H. Davis, Administration of prostaglandin E1 analog reduces rat hepatic and Ito cell collagen gene expression and collagen accumulation after bile duct ligation injury, *Hepatology* 17 (1993) 707–714.
- 55 S.H. Wettlaufer, J.P. Scott, R.C. McEachin, M. Peters-Golden, S.K. Huang, Myofibroblast dedifferentiation by PGE2 is characterized by reversal of the global transcriptome, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (2015) <http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2014-0468OC>.
- 56 L.R.K. Penke, S.K. Huang, E.S. White, M. Peters-Golden, Prostaglandin E2 inhibits α -smooth muscle actin transcription during myofibroblast differentiation via distinct mechanisms of modulation of serum response factor and myocardin-related transcription factor- α , *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 17151–17162, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.558130>.
- 57 E. Ponianowska, D. Sandnes, K. Grzyb, A.R. Schjølberg, M. Aasrum, I.H. Tvetraas, et al., Inhibitory effects of prostaglandin E2 on collagen synthesis and cell proliferation in human stellate cells from pancreatic head adenocarcinoma, *BMC Cancer* 14 (2014) 413, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-14-413>.
- 58 S. Grosch, I. Tegeger, E. Niederberger, L. Bräutigam, G. Geisslinger, COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib, *FASEB J.* 15 (2001) 2742–2744, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.01-0299fje>.
- 59 D. Riendeau, M.D. Percival, S. Boyce, C. Brideau, S. Charleson, W. Cromlish, et al., Biochemical and pharmacological profile of a tetrasubstituted furanone as a highly selective COX-2 inhibitor, *Br. J. Pharmacol.* 121 (1997) 105–117, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0701076>.
- 60 J. Zhang, M. Wang, Z. Zhang, Z. Luo, F. Liu, J. Liu, Celecoxib derivative OSU-03012 inhibits the proliferation and activation of hepatic stellate cells by inducing cell senescence, *Mol. Med. Rep.* 11 (2015) 3021–3026, <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2014.3048>.
- 61 M. Kamata, K. Hosono, T. Fujita, K. Kamata, M. Majima, Role of cyclooxygenase-2 in the development of interstitial fibrosis in kidneys following unilateral ureteral obstruction in mice, *Biomed. Pharmacother.* 70 (2015) 174–180, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2015.01.010>.
- 62 J.C. Bonner, A.B. Rice, J.L. Ingram, C.R. Moomaw, A. Nyska, A. Bradbury, et al., Susceptibility of cyclooxygenase-2-deficient mice to pulmonary fibrogenesis, *Am. J. Pathol.* 161 (2002) 459–470, [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64202-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64202-2).
- 63 C. Vancheri, C. Mastruzzo, M.A. Sortino, N. Crimi, The lung as a privileged site for the beneficial actions of PGE2, *Trends Immunol.* 25 (2004) 40–46.
- 64 V. García-Alonso, E. Titos, J. Alcazar-Quiles, B. Rius, A. Lopategi, C. López-Vicario, et al., Prostaglandin E2 exerts multiple regulatory actions on human obese adipose tissue remodeling, inflammation, adaptive thermogenesis and lipolysis, *PLoS One* 11 (2016), e0153751 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0153751>.
- 65 Y. Zhang, A. Desai, S.Y. Yang, K.B. Bae, M.I. Antczak, S.P. Fink, et al., Inhibition of the prostaglandin-degrading enzyme 15-PGDH potentiates tissue regeneration, *Science* 348 (6240) (2015) <http://dx.doi.org/10.1126/science.1254040>.
- 66 P.R. Colville-Nash, D.W. Gilroy, Cyclooxygenase enzymes as targets for therapeutic intervention in inflammation, *Drug News Perspect.* 13 (2000) 587–597.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Molecular Basis of Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbadis

PGE₂ induces apoptosis of hepatic stellate cells and attenuates liver fibrosis in mice by downregulating miR-23a-5p and miR-28a-5p



Brea R.^a, Motiño O.^a, Francés D.^b, García-Monzón C.^c, Vargas J.^c, Fernández-Velasco M.^d, Boscá L.^{a,e,f}, Casado M.^{e,f,g}, Martín-Sanz P.^{a,e,f,h,1}, Agra N.^{a,h,1}

^a Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) "Alberto Sols", CSIC-UAM, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain

^b Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET), Suipacha 570, 2000 Rosario, Argentina

^c Liver Research Unit, Hospital Universitario Santa Cristina, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, Amadeo Vices 2, 28009 Madrid, Spain

^d Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz, IDIPAZ, Pedro Rico 6, 28029 Madrid, Spain

^e Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Monforte de Lemos 3-5, 28029 Madrid, Spain

^f Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERcv), Monforte de Lemos 3-5, 28029 Madrid, Spain

^g Instituto de Biomedicina de Valencia, IBV-CSIC, Jaume Roig 11, 46010 Valencia, Spain.

ARTICLE INFO

Keywords:
COX-2
Liver
HSC
miRNAs
Fibrosis

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs), small noncoding RNAs modulating messenger RNA (mRNA) and protein expression, have emerged as key regulatory molecules in chronic liver diseases, whose end stage is hepatic fibrosis, a major global health burden. Pharmacological strategies for prevention or treatment of hepatic fibrosis are still limited, what makes it necessary to establish a better understanding of the molecular mechanisms underlying its pathogenesis. In this context, we have recently shown that cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in hepatocytes restricts activation of hepatic stellate cells (HSCs), a pivotal event in the initiation and progression of hepatic fibrosis. Here, we evaluated the role of COX-2 in the regulation of a specific set of miRNAs on a mouse model of CCl₄ and bile duct ligation (BDL)-induced liver fibrosis. Our results provide evidence that COX-2 represses miR-23a-5p and miR-28-5p expression in HSC. The decrease of miR-23a-5p and miR-28-5p expression promotes protection against fibrosis by decreasing the levels of pro-fibrogenic markers α -SMA and COL1A1 and increasing apoptosis of HSC. Moreover, we demonstrate that serum levels of miR-28-5p are decreased in patients with chronic liver disease. These results suggest a protective effect exerted by COX-2-derived prostanoids in the process of hepatofibrogenesis.

1. Introduction

Cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 catalyze the first step in prostanoid biosynthesis. COX-1 is constitutively expressed in many tissues, whereas COX-2 is induced by a variety of stimuli [1]. Adult hepatocytes fail to induce COX-2 expression regardless of the pro-inflammatory factors used [2]. However, our group and others demonstrated that partial hepatectomy (PH) induced COX-2 in hepatocytes and contributed to the progression of cell cycle during regeneration [3]. In addition, COX-2 is up-regulated in the livers of patients with chronic viral hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC), and this upregulation leads to increased production of prostaglandins, mainly

PGE₂ [4].

Liver fibrosis is characterized by an excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) proteins in response to chronic hepatic injury [5]. Hepatic stellate cells (HSC) have been recognized as the principal cell type responsible for ECM formation during hepatic fibrogenesis and TGF- β represents one key factor stimulating collagen and ECM production in these cells [6]. Induction of α -smooth muscle actin (α -SMA) is the most reliable marker of HSC activation [7]. Moreover, hepatic TGF- β 1 is increased in animal models of liver fibrosis and in patients with chronic liver diseases [8] and has been inversely correlated to PGE₂ action over HSCs activation [9].

miRNAs are small non-coding RNAs that negatively regulate their

Abbreviations: COX-2, cyclooxygenase-2; PGE₂, prostaglandin E₂; ALT, alanine transaminase; TGF- β 1, transforming growth factor β 1; BAX, Bcl-2-associated X protein; Bcl-x_l, B-cell lymphoma-extra-large; α -SMA, alpha smooth muscle actin; COL1A1, collagen type 1 alpha 1; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; ERK1, extracellular signal-regulated kinase 1; Bmp2, bone morphogenic protein 2; CDH1, E-Cadherin; Aif2, transcription factor 3; p38, mitogen-activated protein kinase 14; Fn1, fibronectin 1; Apaf1, apoptotic peptidase activating factor 1; Tradd, TNFRSF1A-associated *via* death domain; Cav1, caveolin 1

¹ Corresponding authors at: Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) "Alberto Sols", CSIC-UAM, Madrid, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain.

E-mail addresses: pmartino@iib.uam.es (P. Martín-Sanz), nagra@iib.uam.es (N. Agra).

¹ These two authors share senior authorship.

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.11.001>

Available online 20 November 2017; revised form 30 October 2017; Accepted 1 November 2017

0925-4439/©2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

target genes primarily through RNA destabilization or translational repression. Aberrant miRNA expression is associated with pathologic conditions. In the context of liver diseases, previous studies revealed a role for miRNAs in acute liver injury, viral hepatitis, hepatocarcinogenesis, hepatic fibrosis and NAFLD [10–12]. Up to now, several miRNAs are known to affect different steps of fibrogenesis including HSC activation, proliferation, migration, and ECM deposition. Members of the miR-29 family are downregulated in HSCs in response to TNF- α and TGF- β signaling and suppress the transcription of ECM genes like *Coll1a1* [13]. miR-133a and miR-101 are other miRNAs regulated by TGF- β in HSCs, influencing ECM-related gene translation in liver fibrosis [14]. Next to these antifibrotic miRNAs, several pro-fibrotic miRNAs are up-regulated during fibrogenesis: elevated expression of miR-21 enhances HSC-activation and EMT by activating the PTEN/Akt [15] pathway. Moreover, TGF- β induced up-regulation of both miR-199s and miR-200 that indirectly promotes liver fibrosis by increasing the expression of pro-fibrotic genes (e.g. collagens, MMPs) [16,17].

Regarding COX-2 and the impact of PGE₂ on the development of fibrosis the data are controversial. Some studies indicate that PGs favor the development of hepatic steatosis, NASH and ultimately fibrosis [18–20], while others provide evidence that PGE₂ suppresses fibrogenesis and NASH progression since COX-2 inhibition potentiates inflammation and liver fibrosis [9,21,22]. Our results indicate that constitutive expression of COX-2 in hepatocytes protects against high fat diet-induced steatosis, inflammation, obesity and insulin resistance [23]. These findings prompted us to screen the role of hepatic-specific COX-2 expression in a murine model of fibrosis induced by CCl₄. In our previous work we have demonstrated that expression of COX-2 in hepatocytes was able to diminish the levels of pro-fibrogenic markers and to reduce the progression of the CCl₄-induced fibrotic process by restricting HSC activation and ECM deposition [24], but the involvement of miRNAs has not been analyzed previously. In this study, we examine a group of miRNAs that were modulated in HSC in response to COX-2 hepatocyte-specific expression. miR-23a and miR-28a were found to be downregulated by PGE₂ in a TGF- β -dependent manner, which could attenuates the activation of HSCs, with growth-suppressive and pro-apoptotic activities. Moreover, we demonstrate that serum levels of miR-28 decreased in patients with chronic liver disease. Based on our findings, we propose that miR-23a and miR-28a are part of a novel signaling pathway that mediates a COX-2-dependent protective role by modulating the activation and apoptosis of HSC during hepatofibrogenesis.

2. Experimental procedures

2.1. Animal experimentation

hCOX-2-Tg mice and their corresponding wild type (Wt) litter-mates were generated by systematic mating of the heterozygous B6D2-Tg (APOE-PTGS2/4)^{Upme} expressing 55 copies of transgene with B6D2F1/OlaHsd Wt mice in our animal house for more than seven generations. The hCOX-2-Tg animals were phenotypically similar to their normal litter-mates and did not exhibit a detectable histological change in the liver at 12-weeks of age. Integration of transgene was systematically checked by PCR analysis of genomic tail DNA. Transgenic mice (hCOX-2-Tg) constitutively express human COX-2 in hepatocytes under the control of the human ApoE promoter and its specific hepatic control region (HCR), a unique regulatory domain that directs ApoE expression in liver [25], lacking macrophage-specific regulatory regions (ME.2 and ME.1) [26]. The animals were maintained in light/dark (12 h light/12 h dark), temperature (22 °C) and humidity-controlled rooms with free access to drinking water. Mice were fed with regular chow diet (RCD; SAFE A04-10 Panlab, Barcelona). To induce fibrosis, CCl₄ (1:4 in olive oil) was intraperitoneally (i.p.) administered to hCOX-2-Tg and Wt mice at a dose of 1.6 ml/kg body weight twice-weekly. Control animals were i.p. injected with olive oil. In another

approach to induce fibrosis, some animals were subjected to bile duct ligation (BDL) for 21 days. 9 weeks after CCl₄ treatment or 21 days after BDL, the animals were sacrificed and liver was snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for further mRNA analysis, or fixed in 4% buffered formalin to later make paraffin blocks. Plasma was obtained from retro-orbital sinus.

All animal experimentation was controlled following the recommendations of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) on health monitoring, the European Community Law (86/609/EEC) and the Spanish Law (R.D.1201/2005), and the use of animals in experimental procedures was approved by the Ethics Committee of the Bioethical Commission from CSIC, Spain.

Histochemistry analysis, immunoblot assays, RNA isolation and real-time RT-PCR; hepatic cell isolation and other *in vivo* and *in vitro* experimental procedures are detailed in the Supplementary data section.

2.2. Isolation and culture of hepatic stellate cells (HSC)

The isolation of HSCs from mice livers was performed as described [27] and can be divided into: *In situ* perfusion with pronase (0.4 mg/ml)/collagenase (0.56 mg/ml, increasing 1.5-fold after CCl₄ treatment) solution in William's E medium of mouse liver; subsequent *in vitro* digestion; and density gradient-based separation of HSCs from other hepatic cell populations. Briefly, after the *in situ* digestion, the liver was carefully removed and minced under sterile conditions. The minced liver was further digested *in vitro* with pre-warmed pronase (0.5 mg/ml)/collagenase (0.4 mg/ml)/DNase I (0.1 mg/ml)/HEPES (10 mM) in 1 × HBSS pH 7.4 solution. Then, the liver cell suspension was filtered through a 100 μ m cell strainer to eliminate undigested tissue remnants and centrifuged at 1900 rpm for 10 min at 4 °C. The pellet of non-parenchymal cells was resuspended in GBSS (Sigma) and purified by density gradient centrifugation using 14% Nycodenz (Sigma). HSC cells were collected from the diffuse white interphase layer and centrifuged twice in 1 × PBS/0.3% BSA at 1900 rpm for 5 min at 4 °C. Cells were resuspended directly in 700 μ l QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) for further mRNA analysis or were plated in 6 or 12 multiwell dishes (Corning, New York, USA) with DMEM, 20% FBS and 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 50 μ g/ml gentamicin. Cells were cultured to further mRNA and protein analysis. A primary HSC cell line from Wt mice was established by spontaneous immortalization.

2.3. miRNA microarray analysis

miRNAs were extracted from 26 Wt and 21 hCOX-2-Tg isolated HSC samples after oil or CCl₄ treatment using QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Valencia, CA) and purified with a miRNeasy Mini Kit (Qiagen). The quality and integrity of the microRNAs were assessed in an Agilent Bioanalyzer. Three pools (minimum 3 HSC samples per pool) of miRNAs were prepared for each experimental condition. For miRNA array analysis, we used a miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, 4 × Mouse & Rat panel I + II (Exiqon, Vedbaek, Denmark). It contains pre-aliquoted PCR primer sets in 384-well PCR plates, allowing the study of 748 mouse and rat microRNAs and 6 reference genes.

For cDNA synthesis, RNA (20 ng) was polyadenylated and reverse transcribed to cDNA using a Universal cDNA Synthesis Kit II (Part from miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, Exiqon), according to the manufacturer's instructions. cDNAs were diluted 80 × and were used as the template for quantitative real-time PCR (RT-PCR). ExiLENT SYBR® Green master mix (Exiqon), loaded into pre-aliquoted PCR primer sets in 384-well PCR plates. RT-PCR was performed with a 7900HT Fast-Real Time PCR System (Life Technologies), and the thermocycling parameters were 95 °C for 10 min and 40 cycles of 95 °C for 10 s and 60 °C for 1 min; followed by a dissociation curve consisting of 95 °C for 15 s; 60 °C for 15 s; 95 °C for 15 s. The mean of triplicate probes, analyzed in three pools of each experimental group, was used

for the array, and expressed data were normalized using the global normalization method. The fold change in expression level of each miRNA was determined by comparing the expression levels of miRNAs in COX-2-Tg cells to those in Wt cells. Data analysis was performed using Excel and GenEx2.0 Software. The Heatmaps and clustering of differentially expressed genes were constructed in Excel using conditional formatting.

Microarray data were validated by RT-PCR analysis of individual miRNAs. Analysis of pathways, networks and target genes was performed using miRWalk and “Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery” (DAVID: Functional Annotation Tools) platforms, allowing the identification of several candidate pathways for the miRNA target genes. Cytoscape software was used to illustrate the overlap of the putative miRNAs targets.

2.4. Data analysis

Data are expressed as means \pm S.E of at least three independent experiments. Statistical significance was estimated using Student 2-tailed *t*-test to evaluate the differences between treated and untreated mice or cells within a single genotype and between genotypes. Analysis was performed by using the statistical software GraphPad Prism 5. A $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. miR-23a and miR-28a are specifically repressed by COX-2-derived prostanooids in hepatic stellate cells upon induction of liver fibrosis

To investigate the role of COX-2 activity on fibrosis, we injected CCl₄ in Wt and hCOX-2-Tg mice twice a week for 9 weeks. Liver sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E), Masson's trichrome (MTC) and Picro Sirius Red to evaluate the fibrosis stage and to quantify the fibrotic area. We found that hepatocyte COX-2 expression delayed fibrosis progression induced by CCl₄ treatment, through a decrease in α -SMA and COL1A1 expression and significantly reduced the fibrotic area due to a lesser activation of HSC, in agreement with our previous results (Supplementary Fig. 1) [24]. Since we have demonstrated that COX-2 regulates miRNA processing [28], here we sought to analyze whether miRNAs might be implicated in the COX-2-dependent attenuation of fibrosis.

As CCl₄ is the condition leading to fibrosis, we will compare the hCOX-2-Tg vs. Wt under CCl₄ condition. Microarray analysis in HSC (the most important source of ECM) revealed that in CCl₄ mice, the expression level of 11 miRNAs was downregulated in hCOX-2-Tg mice vs. Wt mice, while the expression of miR-29a was higher ($P \leq 0.05$; fold change cutoff ≥ 1.5) (Fig. 1A). According to previous results, it is well established the powerful anti-fibrotic role of miR-29 in different mouse models of liver fibrosis and in different species including human. Besides, members of the miR-199-family have a pro-fibrotic effect since they are increased in fibrotic liver diseases in both mouse and human [12]. These two miRNAs, along with the two most statistically significant (miR-23a and miR-28a), were chosen to validate the microarray results using real-time qPCR and these data supported the result of the microarray analysis (data not shown).

To determine an HSC-specific role for miR-23a and miR-28 in liver fibrosis, the expression levels of these two miRNAs were examined in primary HSCs isolated from the livers of hCOX-2-Tg mice after 9 weeks of CCl₄ treatment, as well as from Wt mice. The expression of miR-29a and miR-199a was also analyzed. In HSCs from hCOX-2-Tg mice with liver fibrosis, we found a substantial downregulation of miR-23a, miR-28a and miR-199a vs. Wt (Fig. 1B), contrary to what happens in hepatocytes (Fig. 1C). We failed to detect significant differences of miR-23 and miR-28 in total liver and Kupffer cells isolated from fibrotic liver of Wt and Tg mice (Fig. 1D, E). As in HSC, serum levels of miR-23a and miR-28a tend to decrease in Tg mice following treatment with CCl₄

(Fig. 1F).

3.2. PGE₂ attenuates TGF- β -dependent increase of miRNA expression in HSC cells

As miR-23a and miR-28a exhibited a consistent downregulation in HSCs from fibrotic hCOX-2-Tg mice and they were not examined in this context in previous analyses, these miRNAs were selected for further evaluation.

First we investigated whether PGE₂ affects TGF- β -induced HSC activation by regulating miR-23a and miR-28a expression. RT-PCR results demonstrated that PGE₂ significantly decreased the TGF- β 1-dependent rise of miR-23a and miR-28a in isolated HSC cells from Wt mice, as well as in human and murine HSC cell lines, LX2 and GRX, respectively, treated with PGE₂ after TGF- β 1 in comparison with cells activated with TGF- β 1 (Fig. 2A–C). Our results validate the upregulation of pro-fibrogenic genes upon TGF- β 1 treatment and revealed that PGE₂ counteracted TGF- β 1-induction of α -SMA and COL1A1 (Fig. 2D).

To determine whether PGE₂ exerts its effects via the TGF- β 1 classical signaling pathway, we treated HSC with LY364947, an inhibitor of T β R-I. Interestingly, LY364947 significantly prevented the PGE₂ dependent downregulation of miR-23a and miR-28a (Fig. 2E). These data highlight a potential role for TGF- β 1 in the HSC specific regulation of miR-23a and miR-28a by PGE₂ in the process of fibrosis.

3.3. COX-2-Tg mice subjected to bile duct ligation are protected against fibrosis

To confirm our results, we next used a second model of experimental liver fibrosis and analyzed the expression of miR-23a and miR-28a, 21 days after bile duct ligation (BDL) in Wt and hCOX-2-Tg mice. The degree of liver fibrosis was determined by H&E, Picrosirius red and Masson's staining. Histopathological analysis revealed that BDL caused significant bridging fibrosis, but PGE₂ synthesis caused marked reduction in the distribution of collagen fibers in the fibrotic liver of hCOX-2-Tg mice (Fig. 3A). These results, together with the ALT, AST and bilirubin values, confirm the hepatoprotective role of COX-2 on the BDL-induced liver fibrosis in mice (Fig. 3B). As shown in Fig. 3C, miR-23a and miR-28a were downregulated in Tg vs. Wt animals, further supporting the hypothesis that downregulation of miR-23a and miR-28a by PGE₂ constitutes an important feature in murine fibrosis. Fluorescence immunohistochemistry analysis demonstrated that the levels of α -SMA and COL1A1 were higher in BDL mice, compared with the sham-operated, and attenuated in hCOX-2-Tg mice (Fig. 3D–E).

3.4. Relationship between COX-2-regulated miRNAs, TGF- β 1 and apoptosis pathways

To further characterize the functional significance of the differentially miRNAs regulated by COX-2, we performed a systematic analysis of their putative gene targets and searched for pathways which were enriched. Putative target genes were identified by using www.microma.org, a well-established target prediction algorithm for miRNAs. To interpret the biological effect of miR-23a and miR-28a, genes obtained in this analysis were further processed by DAVID 6.7 software for functional pathway enrichment. Various targets of these miRNAs were significantly enriched in different Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways using corrected P value ≤ 0.05 as a threshold, including the top hit ‘pathways in cancer’, but also ‘focal adhesion’, ‘apoptosis’, ‘TGF- β signaling pathway’ and other potentially involved in liver fibrosis (Fig. 4A), suggesting that fibrosis-relevant target genes might be regulated by the putative network of PGE₂/TGF- β 1-dependent miRNAs in HSCs. A total of 10 genes were selected to illustrate the overlap of the COX-2-regulated miRNA target genes. These 10 genes belonged to the affected pathways including apoptosis and TGF- β signaling pathway (Fig. 4B).

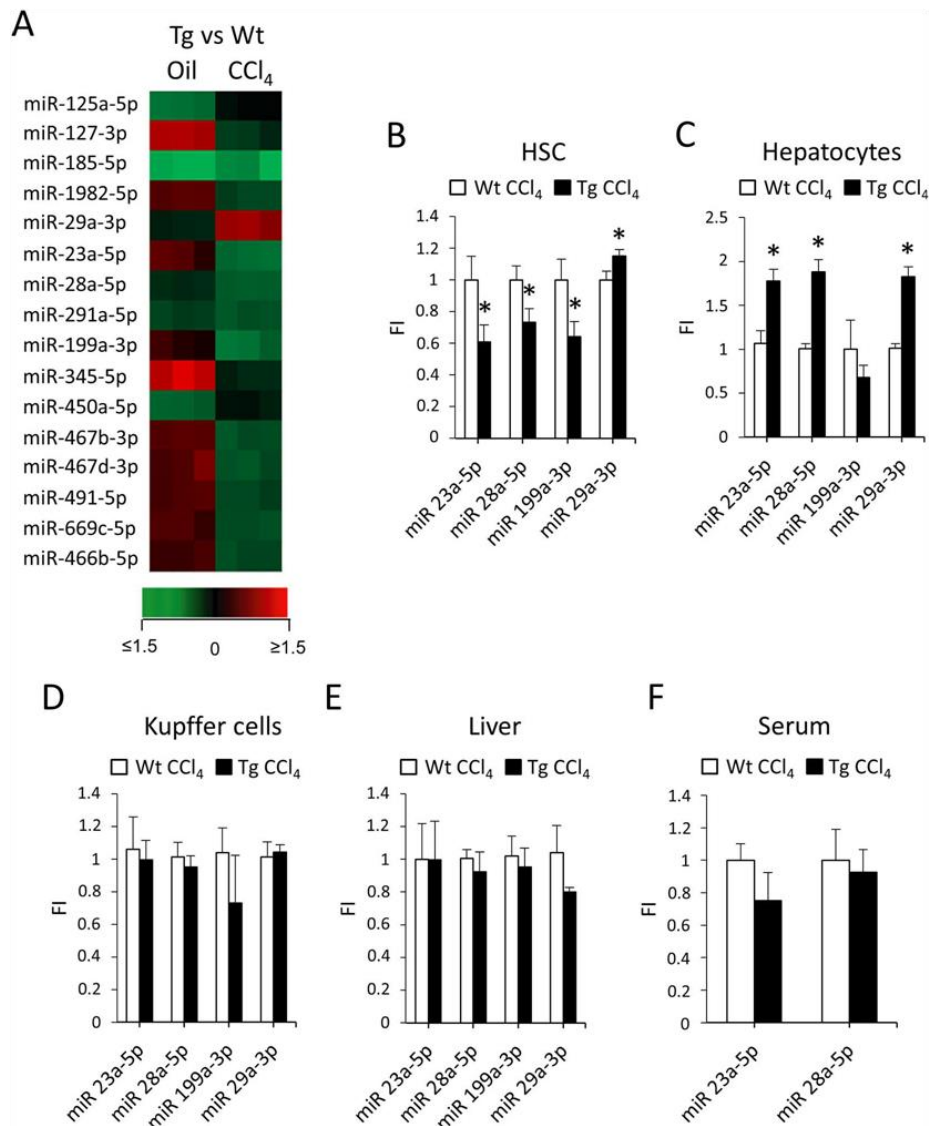


Fig. 1. Expression of miR 23a-5p, miR 28a-5p, miR 199a-3p and miR 29a-3p in Wt and hCOX-2-Tg mice.

(A) Identification of 16 differentially expressed miRNAs in isolated hepatic stellate cells (HSC) from 26 Wt and 21 hCOX-2-Tg after oil or CCl₄ treatment, as detected by quantitative real-time PCR (RT-PCR) array. Three pools (minimum 3 HSC per pool) of miRNAs were prepared for each experimental condition. Values of triplicates are represented in heat map relative to HSC of Wt mice, oil or CCl₄ as appropriate. (B-E) Expression of miRNAs in Wt and hCOX-2-Tg isolated HSC (B), isolated hepatocytes (C), isolated Kupffer cells (D) total liver (E) and serum (F) analyzed by RT-PCR. miRNA expression was normalized to the average of miR 191-5p, miR 103a-3p and RNU5G RNA expression, and expressed as FI (fold induction) vs. Wt CCl₄, defined as 1. Data are means \pm SE of 14-18 (B); 5-7 (C); 4 (D, E, F) mice per group. *P < 0.05 vs. Wt CCl₄.

The deregulation of these putative target genes was finally confirmed by RT-PCR in different HSC cell models: HSC isolated from Wt and hCOX-2-Tg livers treated with CCl₄ and Wt HSC treated with PGE₂ and TGF- β 1. The results confirmed the upregulation of these potential target genes in HSCs in the presence of PGE₂, upon CCl₄ or TGF- β 1 treatment (Fig. 4C). Furthermore, the expression of target genes was downregulated when HSC cells were transfected with miR-23a and miR-28a (Fig. 4D).

3.5. PGE₂ reduced the activation of hepatic stellate cells *in vitro*

Given the crucial role of COX-2 in suppressing liver fibrosis *in vivo*,

we examined whether PGE₂ contributes to modulation of the activation of HSC *in vitro*. HSC were treated with conditioned medium of hepatocytes isolated from Wt and hCOX-2-Tg mice after Oil or CCl₄ treatment. As shown in Fig. 5B, PGE₂ levels were higher in the culture media from Tg hepatocytes. This approach resembles what occurs physiologically in Tg mice. Pro-fibrogenic markers such as α -SMA and COL1A1, were measured by immunofluorescence and as shown in Fig. 5A, HSC-Tg and HSC-Tg-CCl₄ cells showed lesser levels of both markers confirming our previous results [24]. Moreover, pSmad2/3 was decreased in HSC-Tg-CCl₄ cells in comparison with Wt-CCl₄ (Fig. 5C).

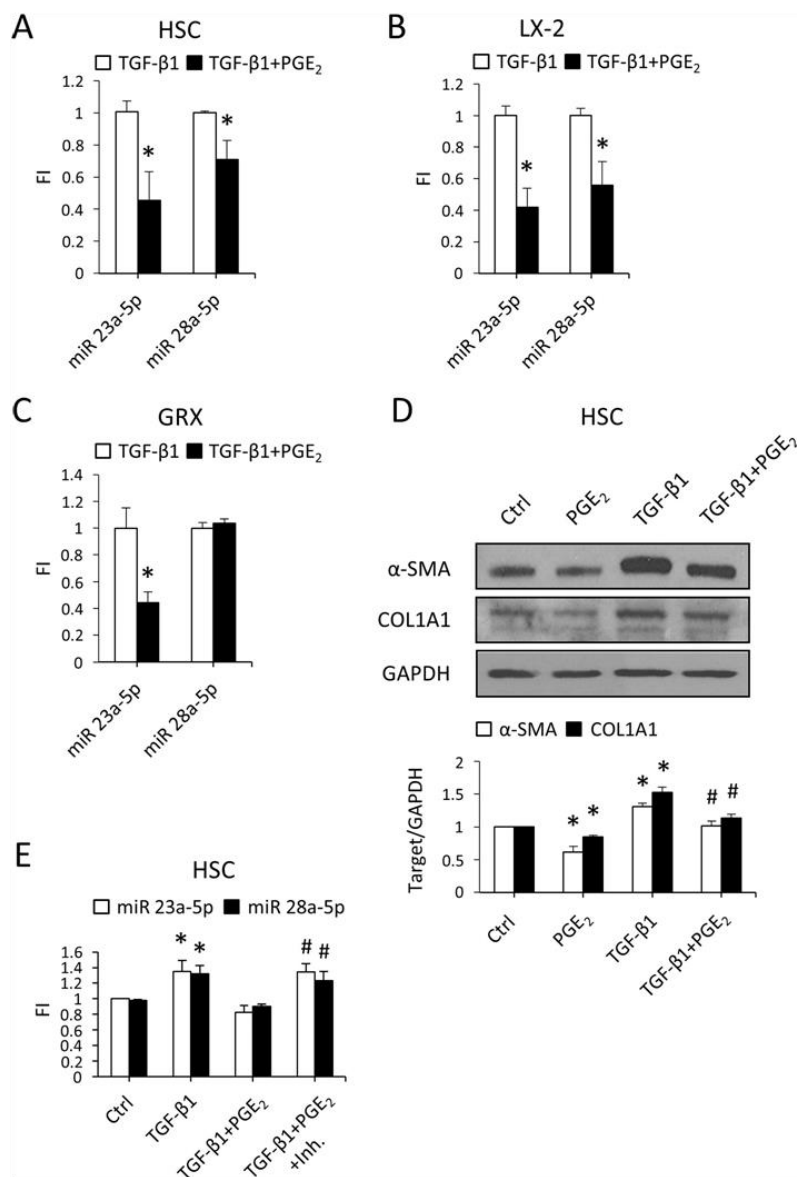


Fig. 2. COX-2-dependent PGs regulate the expression of miR-23a-5p and miR-28a-5p in HSC.

(A, B, C) Validation of the downregulated expression of miR-23a-5p and miR-28a-5p by PGE₂ in primary HSC (A), LX-2 cells (B) and GRX cells (C) analyzed by RT-PCR. Cells were treated with 5 μ M PGE₂ (overnight) and 2 ng/ml TGF- β 1 (6 h). * P < 0.05 vs. TGF- β 1 treated cells. (D) Representative Western blot (up) showing expression of α -SMA and COL1A1 protein levels. For densitometric analysis, the relative level of Control (Ctrl) expression was defined as 1, and GAPDH served as a loading control. Results are expressed as band ratio. * P < 0.05 vs. Ctrl. # P < 0.05 vs. TGF- β 1 treated cells. (E) Expression of miR-23a-5p and miR-28a-5p in primary HSC cells, treated with 5 μ M PGE₂, 2 ng/ml TGF- β 1 and 3 μ M T β R-I inhibitor (LY364947). miRNA expression was normalized to the average of miR-191-5p, miR-103a-3p and RNU5G RNA, and expressed as FI vs. Ctrl. Data are means \pm SE of three independent experiments. * P < 0.05 vs. Ctrl. # P < 0.05 vs. TGF- β 1 + PGE₂ treated cells.

3.6. PGE₂ has a growth-suppressive and pro-apoptotic role in HSC cells

We then investigated the effects of PGE₂ on HSC proliferation and apoptosis. We found that PGE₂ decreases the CCl₄-induced Ki-67 and PCNA expression, markers of cell proliferation (Fig. 6A). Moreover, as determined by the MTT cell viability assay, incubation with conditioned media from Tg mice hepatocytes caused a significant inhibition of HSC cell proliferation (Fig. 6B).

To determine whether the observed suppressive effect of cell growth by PGE₂ was due to an induction of apoptosis, cell death was evaluated by immunostaining of the pro-apoptotic proteins BAX and cleaved caspase-3, showing that expression of COX-2 in hepatocytes led to an increase expression of these pro-apoptotic markers in HSC (Fig. 6C, D and Supplementary Fig. 2). These findings indicate that PGE₂ induces cell death and reduces subsequent proliferative activity specifically in

HSCs.

3.7. Ectopic expression of miR-23a and miR-28a induced HSC cell activation

Next, we transiently transfected HSC with a vector expressing miR-23a and miR-28 separately or in combination (Supplementary Fig. 3A–B). As shown in Fig. 7A, the transfection with miR-23a significantly increased α -SMA and COL1A1 protein levels in HSCs, reflecting their pro-fibrotic function. We analyzed a potential additive effect of miR-23a and miR-28a on the expression of fibrotic markers. Co-transfection of miR-23a and miR-28a into HSC did not show a synergistic effect. Furthermore, overexpression of miR-23a and miR-28a counteracted the effect of PGE₂ on the expression of α -SMA and COL1A1 after TGF- β 1 treatment of HSCs, further highlighting the role

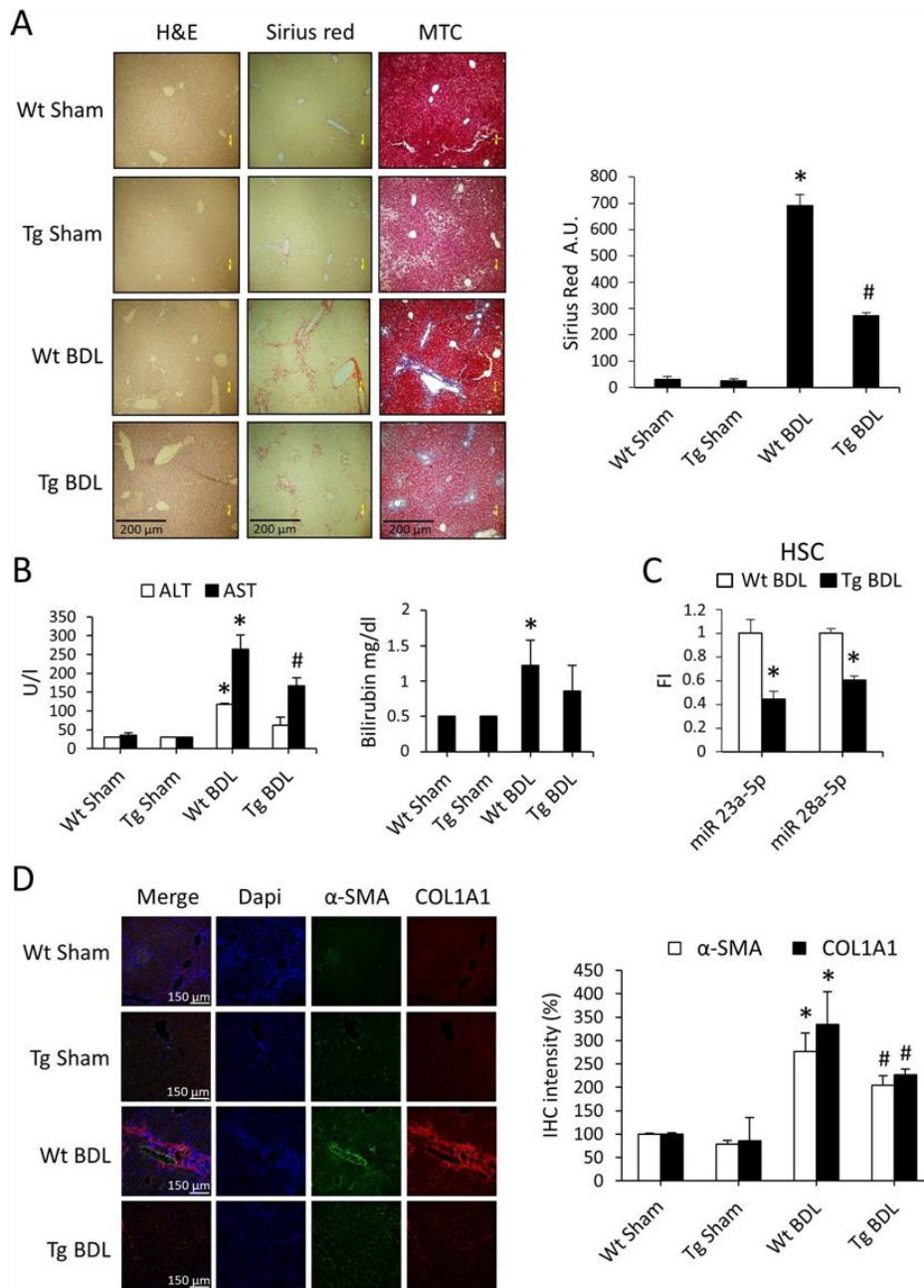


Fig. 3. *miR-23a-5p* is differentially expressed in hCOX-2-Tg mice after BDL. (A) Representative images of hematoxylin/eosin (H&E), Picro-Sirius Red and Masson's trichromic (MTC) stained liver paraffin-embedded sections from Wt and hCOX-2-Tg mice after bile duct ligation (BDL). Values of Sirius Red are represented in arbitrary units (A.U.). * $P < 0.05$ vs. Wt Sham. # $P < 0.05$ vs. Wt BDL. (B) Blood levels of ALT, AST (U/l) and bilirubin (mg/dl) from Wt and hCOX-2-Tg mice after BDL. * $P < 0.05$ vs. Wt Sham. (C) Expression of miR-23a-5p and miR-28a-5p in Wt and hCOX-2-Tg after BDL analyzed by RT-PCR. miRNA expression was normalized to the average of miR-191-5p, miR-103a-3p and RNU5G RNA, and expressed as FI (fold induction) vs. Wt BDL defined as 1. Data are means \pm SE (n = 3-4 mice per group). * $P < 0.05$ vs. Wt BDL. (D) Representative fluorescent immunohistochemistry (IHC) for α -SMA and COL1A1 staining (left panel) from Wt and hCOX-2-Tg mice after BDL. Relative values of α -SMA and COL1A1 IHC intensity (%) are at right. * $P < 0.05$ vs. Wt Sham. # $P < 0.05$ vs. Wt BDL.

of these miRNAs in the regulation of collagen during hepatofibrogenesis (Fig. 7B). Next, we measured ERK1, BMP2 and CDH1 protein levels, target genes implicated in apoptosis, TGF- β signaling and focal adhesion pathways identified in Fig. 4, and as expected these proteins were increased in HSC cells stimulated with PGE₂ after TGF- β 1 compared

with TGF- β 1. Transfection with miR-23a and miR-28a reversed this effect (Fig. 7B). In cells transfected with miR-23a and/or miR-28a, we observed a significant increase in cell viability compared with cells transfected with control miRNA and treated with PGE₂ and TGF- β 1, as assessed by MIT cell viability assays (Fig. 7C). Moreover, the

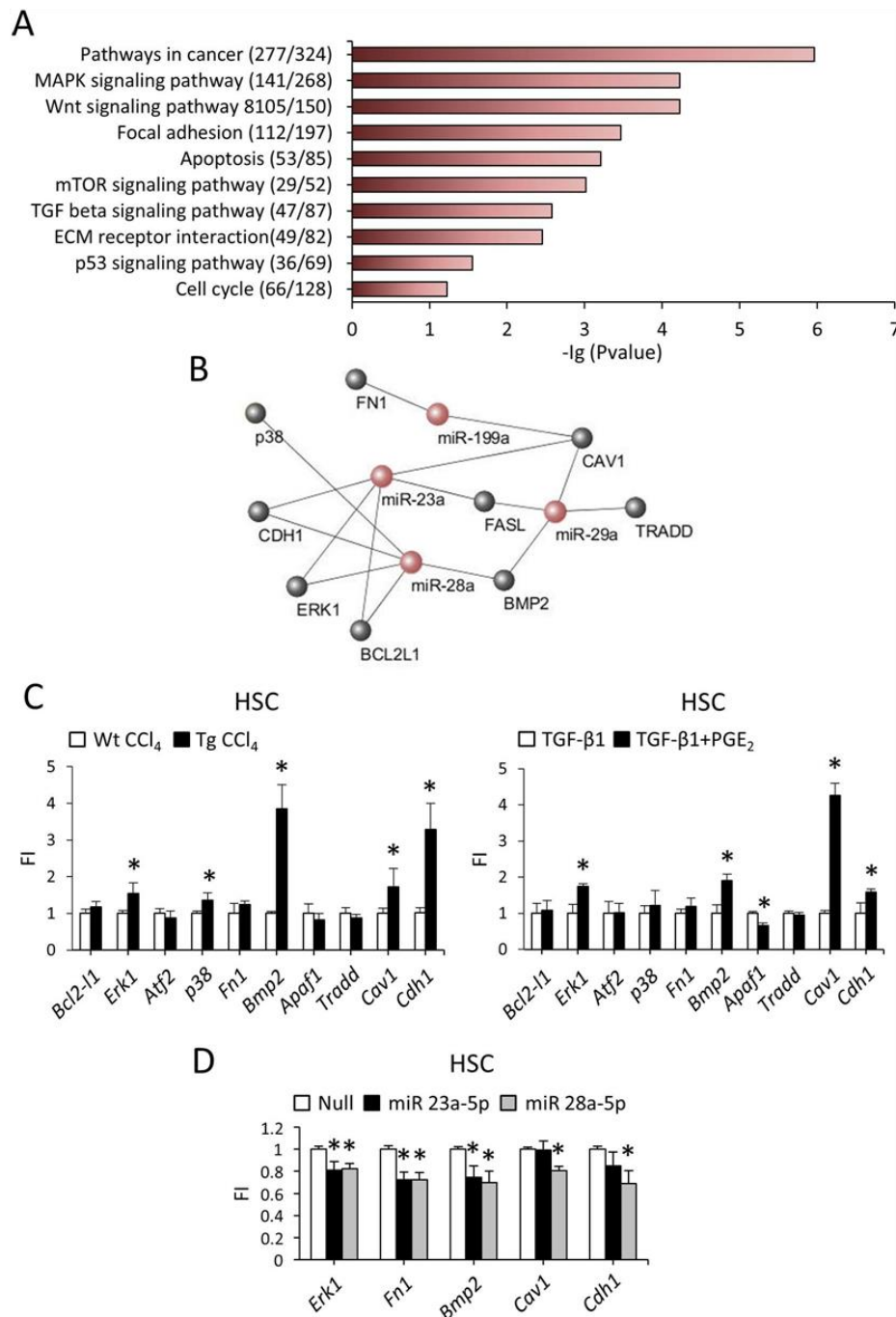


Fig. 4. Functional enrichment of miRNA putative gene targets.

(A) KEGG pathway enrichment. The top most significantly enriched specific terms were plotted against the negative log₁₀ of the *P* value. Number of target genes and total genes for each term are given in parentheses. There is enrichment of terms related to cell death, actin-filament based processes, proliferation and fibrosis. (B) Interactions within the differentially regulated miRNAs and their gene targets were illustrated using Cytoscape. (C) Expression of *Bcl2-l1*, *Erk1*, *Atf2*, *p38*, *Fn1*, *Bmp2*, *Apaf1*, *Tradd*, *Cav1* and *Cdh1* RNA in isolated HSC from Wt and hCOX-2-Tg mice treated with CCl₄ (left), and in primary HSC treated with 5 μM PGE₂ and 2 ng/ml TGF-β1 (right), analyzed by RT-PCR. Values are FI vs. Wt CCl₄ or TGF-β1 defined as 1. **P* < 0.05 vs. Wt CCl₄ (left) or vs. TGF-β1 treated cells (right). (D) Expression of *Erk1*, *Fn1*, *Bmp2*, *Cav1* and *Cdh1* RNA in transfected HSC cells, analyzed by RT-PCR. Primary HSC were transfected with pEGP-miR Null, miR 23a-5p or miR 28a-5p for 48 h, using Lipofectamine 2000. Values are normalized to 36b4 RNA and expressed as FI vs. Null. Data are means ± SE of 3-5/14-18 mice per group (C left) or ± SE of three independent experiments (C right, D). **P* < 0.05 vs. Null.

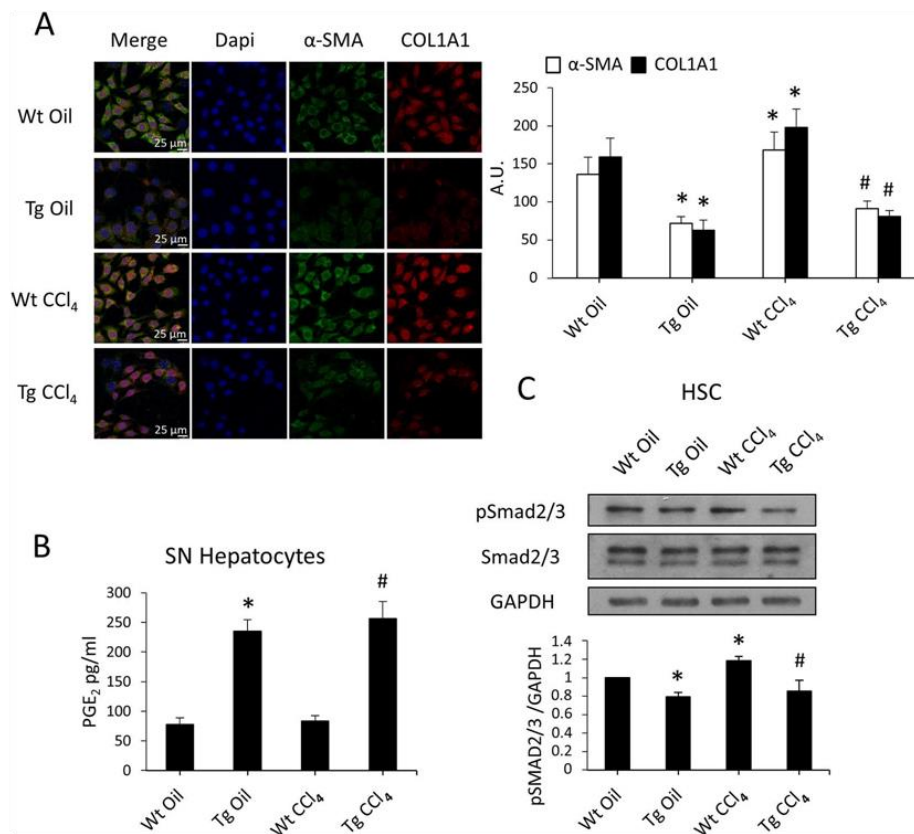


Fig. 5. Conditioned medium from hCOX-2-Tg mice isolated hepatocytes protects against HSC activation.

Primary HSC were treated with conditioned medium from Wt and hCOX-2-Tg mice isolated hepatocytes after oil or CCl₄ treatment. (A) Representative images of α-SMA and COL1A1 immunofluorescence. Cells were analyzed by confocal microscopy and the fluorescence intensity was digitalized and measured. Values of the average fluorescence intensity are expressed up right, in arbitrary units (A.U.). (B) Measured levels of PGE₂ in conditioned medium from Wt and hCOX-2-Tg mice isolated hepatocytes after 24 h of culture. (C) Representative Western blot (up) showing expression of Smad 2/3 protein levels. For densitometric analysis, the relative level of Wt oil expression was defined as 1, and GAPDH served as a loading control. Data are expressed as band ratio. Data are represented as means ± SE of three independent experiments. *P < 0.05 vs. Wt oil. #P < 0.05 vs. Wt CCl₄.

overexpression of these miRNAs reduced the apoptosis, as measured by cleaved caspase-3 and Bcl-xL protein levels, opposite to the effect of PGE₂ (Fig. 7D).

3.8. Serum levels of miR-23a and miR-28a are differentially regulated in patients with liver fibrosis

We analyze miRNAs expression in serum of 25 non-diabetic patients with a clinical diagnosis of fibrosis (grade I-III), who underwent a liver biopsy for diagnostic purposes, and compared them to the sera of 13 healthy controls (normal liver, NL). There was a reduction in the expression of miR-28a with the progression of hepatic fibrosis in relation to the increase levels of PGE₂ (Supplementary Fig. 4A–B) and a correlation between serum PGE₂ and miR-28-5p expression (Supplementary Fig. 4D). Analysis of miRNAs expression in available samples of liver tissue from these patients shows that miR-28a expression does not vary with fibrosis progression, whereas miR-23a expression tends to decrease (Supplementary Fig. 4C), suggesting there might be a similar regulation and function of these miRNAs in human fibrogenesis and in murine experimental fibrotic process.

4. Discussion

The current report proposes a novel miRNA-dependent mechanism

by which COX-2 modulates liver fibrosis. Hepatocyte COX-2 expression represses miR-23a-5p and miR-28a-5p expression in HSC and exerts a protective effect in the process of liver fibrosis through the activation of apoptosis and the decrease in pro-fibrogenic markers.

Liver injury leading to fibrosis occurs in response to a variety of insults including alcohol, viral hepatitis, steatosis and insulin resistance. Fibrosis is the consequence of an overactive wound healing process in response to the injury. Initially, this process is driven by an inflammatory response and results in a controlled deposition of extracellular matrix; however, if the underlying insult persists, there is an excessive deposition of extracellular matrix including cross-linking of collagen. The critical step in the development of scar is activation of hepatic stellate cells (HSCs), which become the primary source of extracellular matrix [29]. Our previous data indicates that constitutive hepatocyte COX-2 expression ameliorates liver fibrosis development in mice by reducing inflammation, and by modulating activation of hepatic stellate cells [24].

miRNAs play essential roles in virtually all cellular and biological processes including liver development, differentiation and homeostasis. Altered expression levels of miRNAs were observed in patients with liver diseases e.g. liver steatosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma [10,11,30]. Expression pattern of miRNAs are organ- and cell-specific. As we have observed, miRNAs are not homogeneously distributed in the liver, but are selectively expressed and regulated in distinct hepatic cell

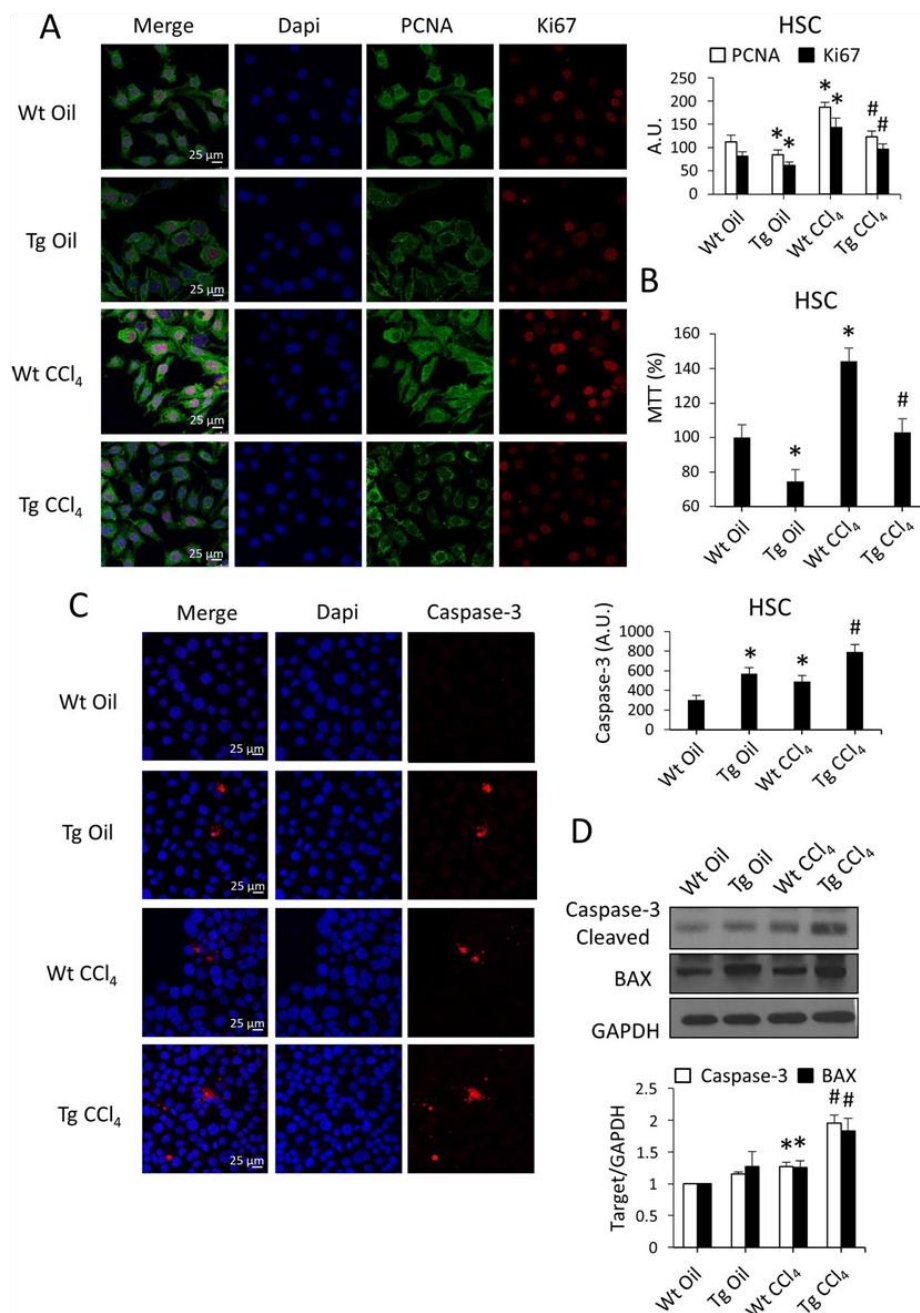


Fig. 6. Conditioned medium from hCOX-2-Tg mice isolated hepatocytes induces apoptosis and decreases the proliferation of HSC. Primary HSC were treated with conditioned medium from Wt and hCOX-2-Tg mice isolated hepatocytes after oil or CCl₄ treatment. (A) Representative images of PCNA and Ki67 immunofluorescence. Cells were analyzed by confocal microscopy and the fluorescence intensity was digitalized and measured. Values of the average fluorescence intensity are expressed in arbitrary units (A.U.). (B) MTT experiment represented in percentage (Wt oil is 100). (C) Representative images of caspase-3 immunofluorescence. Values of the average fluorescence intensity are expressed in arbitrary units (A.U.). (D) Representative Western blot showing expression of cleaved caspase-3 and BAX protein levels. For densitometric analysis, the relative level of Wt oil expression was defined as 1, and GAPDH served as a loading control. Data are expressed as band ratio. Data are means ± SE of three independent experiments. *P < 0.05 vs. Wt oil. #P < 0.05 vs. Wt CCl₄.

types. Our results show opposite regulation of miR-23a and miR-28a in HSCs compared to hepatocytes, which is in agreement with previous reports indicating that miR-29 was found to be down-regulated in HSCs during hepatofibrogenesis, while its expression was up-regulated in

hepatocytes and cholangiocytes during experimental biliary atresia, reinforcing the concept of cell-specific functions of miRNAs in liver pathophysiology [31]. In addition, our results showing an antifibrotic role of miR-29a are widely supported by the literature. Wang, et al.,

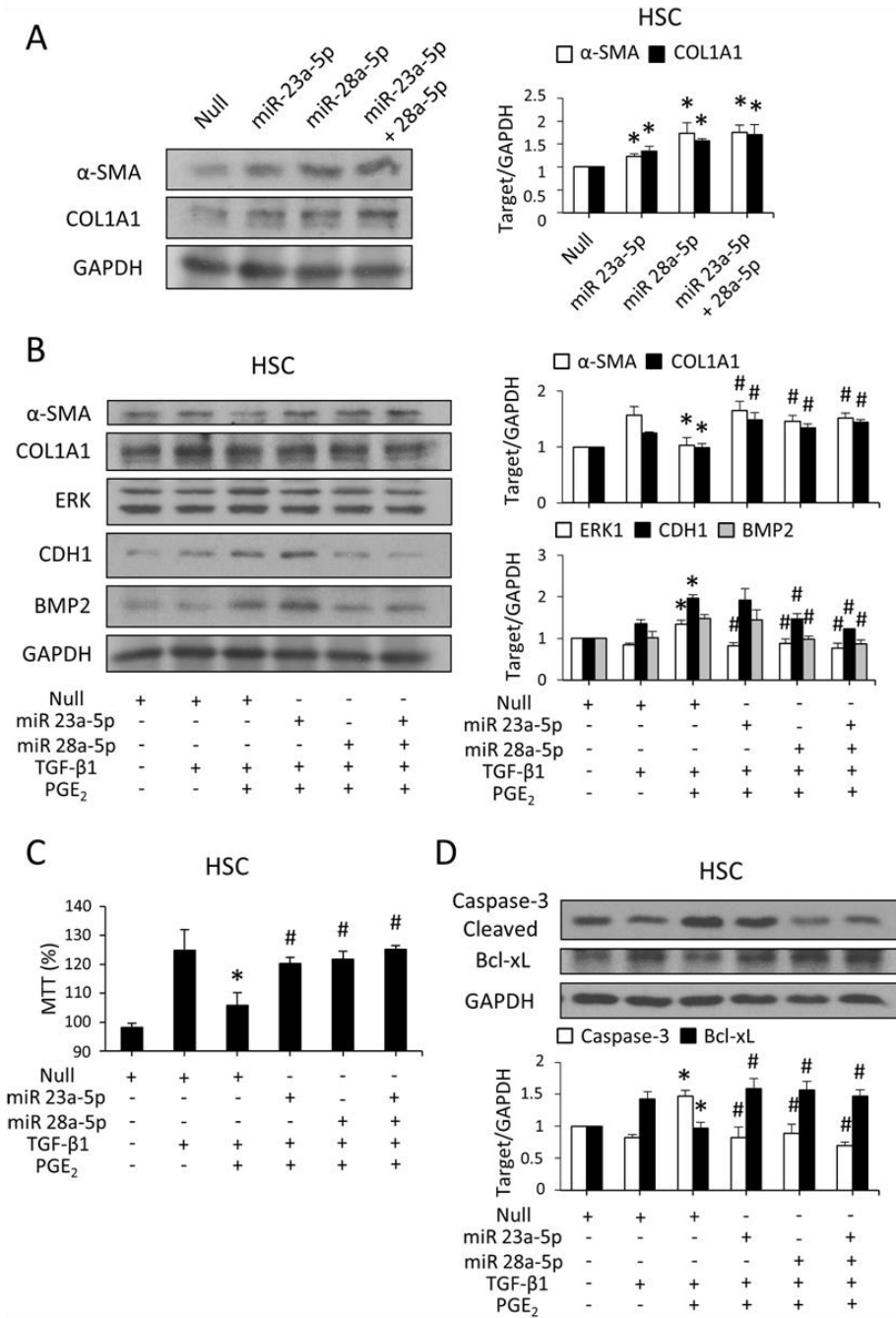


Fig. 7. miR 23a-5p and miR 28a-5p induce fibrosis and decrease apoptosis in transfected HSC. Primary HSC were transfected with pEGP-miRNull, miR23a-5p or miR28a-5p for 48 h, using Lipofectamine 2000. (A) Representative Western blot of α -SMA and COL1A1. * $P < 0.05$ vs. Null. (B, C, D) Cells were treated with 5 μ M PGE₂ and 2 ng/ml TGF- β 1, in addition to transfection. (B) Representative Western blot of α -SMA, COL1A1, ERK, CDH1 and BMP2. (C) MTT experiment relative to Null (100). (D) Representative Western blot of caspase 3 cleaved and Bcl-xL. For densitometric analysis, the relative level of Null was defined as 1, and GAPDH served as a loading control. Data are expressed as bandratio. Data are means \pm SE of three independent experiments. * $P < 0.05$ vs. TGF- β 1 + Null; # $P < 0.05$ vs. TGF- β 1 + PGE₂ + Null.

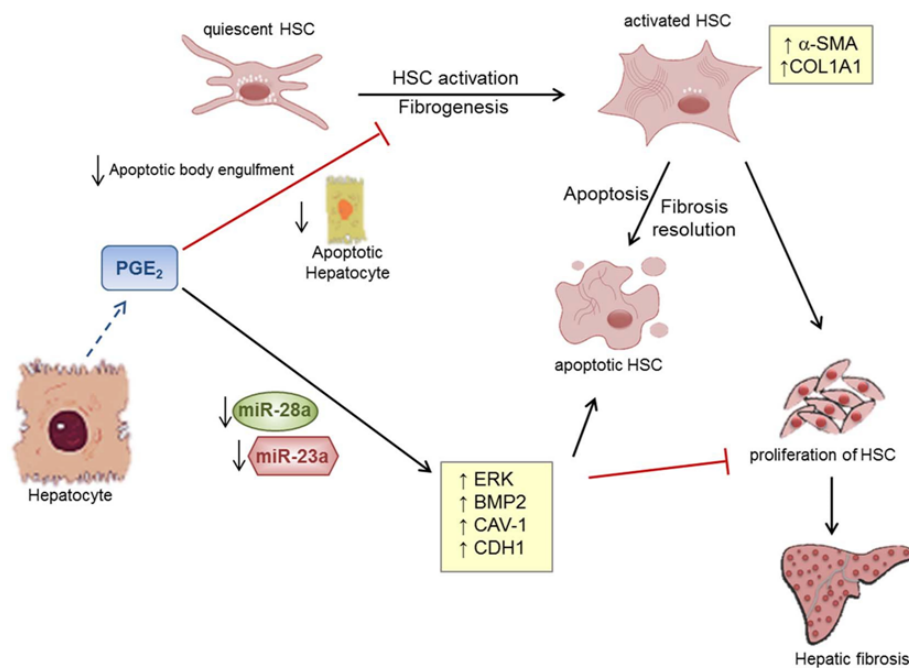


Fig. 8. Synthesis of PGE₂ in hepatocytes protects against fibrosis.

In the presence of PGE₂, the apoptosis of the hepatocytes decreases and, therefore, the apoptotic body engulfment by the HSCs, thus reducing its activation. Moreover, PGE₂ down-regulates miR-23a and miR-28a expression in HSCs, resulting in an increase of ERK, BMP2, CAV1 and CDH1 levels. This leads to an increment in apoptosis together with an inhibition of HSC proliferation. As a consequence, a decrease of α-SMA and COL1A1 is shown in HSC.

demonstrated that miR-29 attenuated HSC activation and induced their apoptosis *via* inhibition of PI3K/AKT pathway in CCl₄-induced fibrosis mouse [32]. Moreover, systemic injection of miR-29a expressing adeno-associated virus in mice demonstrated reversal of histologic and biochemical evidence of hepatic fibrosis despite continued exposure to CCl₄ [33].

The role of COX-2 dependent PGs in liver fibrosis is controversial. Some studies indicate that PGs favor the development of hepatic steatosis, NASH and ultimately fibrosis [18–20], while others provide evidence that PGE₂ suppresses fibrogenesis [9,21,22]. The discrepancy on the effect of COX-2 function can partly be attributed to the application of different experimental models. COX-2 inhibitors could also influence gene expression *via* COX-2-independent pathways. To overcome the limitations of pharmacological inhibition of COX-2, we used a Tg mice model with enhanced hepatocyte-specific hCOX-2 expression. We found that in Tg mice, the severity of hepatic fibrosis developed after CCl₄ was lesser than in Wt mice, as demonstrated by reduced degree of fibrosis. Moreover, our result indicate that PGE₂ inhibits HSC activation induced by TGF-β. It is known [34] that PGE₂ abrogated the stimulatory effects of TGF-β on collagen and fibronectin production in lung fibroblasts. The stimulation of endogenous PGE₂ production by TGF-β may serve as negative feedback mechanism to limit the increase in extracellular matrix protein production induced by this cytokine. We validate the upregulation of pro-fibrogenic genes upon TGF-β1 treatment and revealed that PGE₂ counteracted TGF-β1-induction of α-SMA and COL1A1 in isolated HSC. Our results also show that miR-23a and miR-28a are downstream effectors participating in COX-2 function during fibrogenesis and that inhibition of TβR-I significantly prevented the PGE₂ dependent downregulation of miR-23a and miR-28a.

We analyzed the enriched signaling pathways among the predicted targets of the miRNAs regulated by COX-2 in HSC cells and focused in apoptosis and TGF-β signaling, based on our previous results indicating that hepatocyte COX-2 expression ameliorates NASH and liver fibrosis

development in mice by reducing inflammation, oxidative stress and apoptosis and by modulating activation of HSC [24]. Some of these miRNA target genes were validated by RT-PCR and *Erk1*, *Bmp2*, *Cav-1* and *Cdh1* exhibited increased expression in isolated HSC from COX-2-Tg liver treated with CCl₄ as well as in HSC incubated with TGF-β and PGE₂. All these genes have antifibrotic and pro-apoptotic functions [35] and their protein levels were increased in HSC cells stimulated with PGE₂ after TGF-β1 treatment. Moreover, transfection with miR-23a and miR-28a reversed this effect and reduced the apoptosis of HSC cells, opposite to the effect of PGE₂. These results demonstrate that PGE₂ downregulates miR-23a and miR-28a expression in HSCs, resulting in an increase of ERK, BMP2, CAV1 and CDH1 levels. This leads to an increment in apoptosis together with an inhibition of HSC proliferation. As a consequence, a decrease of α-SMA and COL1A1 is shown in HSC.

In line with our data, it has been described that COL1A2 is down-regulated in fibroblast-derived extracellular matrix *via* Ras-dependent activation of the MEK/ERK signaling pathway and that Sp1 is an important mediator of this feedback inhibition [36]. Bone morphogenetic proteins (BMPs), members of the TGF-β superfamily, have anti-fibrotic functions in multiple organs. BMP2 opposes the fibrogenic function of TGF-β in pancreatic stellate cells through the Smad1 signaling pathway, inhibiting TGF-β-induced α-SMA and COL1A1 [37] and inducing apoptosis in mouse hybridoma MH60 cells through the activation of TGF-β-activated kinase (TAK1) and subsequent phosphorylation of p38 stress-activated protein kinase [38]. Regarding caveolin-1 (CAV-1), our results agree with *in vitro* data for the fibromir miR-199a-5p, which is regulated by TGF-β signaling in response to lung injury. Specifically, miR-199a targets CAV-1, a potent negative regulator of TGF-β signaling cascade [39]. By other hand, CAV-1 overexpression resulted in inhibition of α-SMA expression and cell proliferation by blocking the progression through the G1 phase in murine fibroblast [40]. Finally, it has been shown that an increase of E-cadherin expression promotes HSC apoptosis [41] and correlates with the inhibition of LX2 and HSC-T6

cell proliferation after icaritin treatment, a known apoptosis inducer of HSC [42].

Aberrant apoptosis is a feature of chronic liver diseases and is associated with worsening stages of fibrosis. After toxic exposure, hepatocytes undergo apoptosis and hepatic stellate cells migrate to the site of injury to engulf the apoptotic bodies. This engulfment promotes activation of the hepatic stellate cells to hepatic myofibroblasts, and in their activated state these cells promote deposition of extracellular matrix and scar formation in the liver. However, apoptosis is also the main mechanism promoting the resolution of fibrosis [29].

When liver fibrosis resolves, the activated HSCs are either returning to a quiescent state or undergoing apoptosis, which causes a decrease in the number of activated HSCs (Fig. 8).

4.1. Conclusions

Based on our results, we propose that hepatocyte COX-2 expression attenuates liver fibrosis in part through the production of PGE₂ which exerts its hepatoprotective role in at least two different ways: by decreasing hepatocyte apoptosis [24], thus reducing HSC activation; and by downregulation of miR-23a and miR-28a in HSC, decreasing proliferation and increasing its apoptosis, leading to fibrosis resolution (Fig. 8).

Moreover, in this study we detected significantly reduced serum levels of miR-28a in patients with liver fibrosis, and high serum PGE₂ levels were associated with the progression to more advanced fibrosis stages. We hypothesize this fact as a response in order to exert a protective role against liver fibrosis and contribute to its resolution.

Pharmacological strategies to prevent or treat liver fibrosis are still limited. The prospect of treating patients with liver disease with a pharmacological agent to cause the regression of fibrosis is exciting, but further investigation is required into the long-term-efficacy. The link between HSC specific downregulation of miR-23a and miR-28a by PGE₂ and their relation to ECM and apoptotic genes, as well as the prevention of HSCs activation exerted by PGE₂ highlight a potential role for these miRNAs in HSC and may provide further pharmacological targets.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.11.001>.

Funding

This work was supported by Financing Program for short stays abroad for Assistant Researchers (CONICET-Argentina) and i-COOP2016-20213 to D.F.; SAF2014-52492 (MINECO, Spain) to L.B.; CIBERcv and CIBERhd (ISCIII, Spain) to L.B., P.M.S. and M.C.; PI13/01299 (ISCIII, Spain) to C.G.-M.; SAF2013-43713-R, SAF2016-75004-R and SAF2015-70270-REDT (MINECO, Spain) to L.B., P.M.S. and M.C. We thank FEDER for financial support.

Transparency document

The [Transparency document](#) associated with this article can be found, in the online version.

References

- E. Ricciotti, G.A. FitzGerald, Prostaglandins and inflammation, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (2011) 986–1000, <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>.
- P. Martín-Sanz, N.A. Callejas, M. Casado, M.J. Díaz-Guerra, L. Boscá, Expression of cyclooxygenase-2 in foetal rat hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide and pro-inflammatory cytokines, *Br. J. Pharmacol.* 125 (1998) 1313–1319, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0702196>.
- M. Casado, N.A. Callejas, J. Rodrigo, X. Zhao, S.K. Dey, L. Boscá, et al., Contribution of cyclooxygenase 2 to liver regeneration after partial hepatectomy, *FASEB J.* 15 (2001) 2016–2018, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.01-0158he>.
- A. Fernández-Alvarez, C. Llorente-Izquierdo, R. Mayoral, N. Agra, L. Boscá, M. Casado, et al., Evaluation of epigenetic modulation of cyclooxygenase-2 as a prognostic marker for hepatocellular carcinoma, *Oncogenesis* 1 (2012) e23, <http://dx.doi.org/10.1038/oncsis.2012.23>.
- R. Bataller, D.A. Brenner, Liver fibrosis, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 209–218, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI24282>.
- F. Tacke, R. Weiskirchen, Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques, *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 6 (2012) 67–80, <http://dx.doi.org/10.1586/egh.11.92>.
- S.L. Friedman, Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 125–172, <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00013.2007>.
- A. Castilla, J. Prieto, N. Fausto, Transforming growth factors beta 1 and alpha in chronic liver disease. Effects of interferon alfa therapy, *N. Engl. J. Med.* 324 (1991) 933–940, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199104043241401>.
- A.Y. Hui, A.J. Dannenberg, J.Y. Sung, K. Subbaranaiah, B. Dui, P. Olinga, et al., Prostaglandin E2 inhibits transforming growth factor beta 1-mediated induction of collagen alpha 1(I) in hepatic stellate cells, *J. Hepatol.* 41 (2004) 251–258, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2004.04.033>.
- D.M.S. Ferreira, A.L. Simão, C.M.P. Rodrigues, R.E. Castro, Revisiting the metabolic syndrome and paving the way for microRNAs in non-alcoholic fatty liver disease, *FEBS J.* 281 (2014) 2503–2524, <http://dx.doi.org/10.1111/febs.12806>.
- C. Roderburg, G.W. Urban, K. Bettermann, M. Vucur, H. Zimmermann, S. Schmidt, et al., Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis, *Hepatology* 53 (2011) 209–218, <http://dx.doi.org/10.1002/hep.23922>.
- Y. Murakami, H. Toyoda, M. Tanaka, M. Kuroda, Y. Harada, F. Matsuda, et al., The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families, *PLoS One* 6 (2011) e16081, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016081>.
- S. Bandyopadhyay, R.C. Friedman, R.T. Marquez, K. Keck, B. Kong, M.S. Icardi, et al., Hepatitis C virus infection and hepatic stellate cell activation downregulate miR-29: miR-29 overexpression reduces hepatitis C viral abundance in culture, *J. Infect. Dis.* 203 (2011) 1753–1762, <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jir186>.
- C. Roderburg, M. Luedde, D. Vargas Cardenas, M. Vucur, T. Mollnow, H.W. Zimmermann, et al., miR-133a mediates TGF-beta-dependent depression of collagen synthesis in hepatic stellate cells during liver fibrosis, *J. Hepatol.* 58 (2013) 736–742, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.11.022>.
- J. Wei, L. Feng, Z. Li, G. Xu, X. Fan, MicroRNA-21 activates hepatic stellate cells via PTEN/Akt signaling, *Biomed. Pharmacother.* 67 (2013) 387–392, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2013.03.014>.
- Y. Xiao, J. Wang, Y. Chen, K. Zhou, J. Wen, Y. Wang, et al., Up-regulation of miR-200b in biliary atresia patients accelerates proliferation and migration of hepatic stellate cells by activating PI3K/Akt signaling, *Cell. Signal.* 26 (2014) 925–932, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.01.003>.
- T. Ma, X. Cai, Z. Wang, L. Huang, C. Wang, S. Jiang, et al., miR-200c accelerates hepatic stellate cell-induced liver fibrosis via targeting the FOG2/PI3K pathway, *Biomed. Res. Int.* 2017 (2017) 2670658, <http://dx.doi.org/10.1155/2017/2670658>.
- S.M. Kim, K.C. Park, H.G. Kim, S. J. Han, Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor meloxicam on liver fibrosis in rats with ligated common bile ducts, *Hepatol. Res.* 38 (2008) 800–809, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1872-034X.2008.00339.x>.
- Y.-H. Paik, J. K. Kim, J. I. Lee, S.H. Kang, D.Y. Kim, S.H. An, et al., Celecoxib induces hepatic stellate cell apoptosis through inhibition of Akt activation and suppresses hepatic fibrosis in rats, *Gut* 58 (2009) 1517–1527, <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2008.157420>.
- J. Yu, E. Ip, A. Dela Pena, J.Y. Hou, J. Sessa, N. Pera, et al., COX-2 induction in mice with experimental nutritional steatohepatitis: role as pro-inflammatory mediator, *Hepatology* 43 (2006) 826–836, <http://dx.doi.org/10.1002/hep.21108>.
- A.Y. Hui, W.K. Leung, H.L. Chan, F.K. Chan, M.Y. Go, K.K. Chan, et al., Effect of celecoxib on experimental liver fibrosis in rat, *Liver Int.* 26 (2006) 125–136, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1478-3231.2005.01202.x>.
- Y. Kamada, K. Mori, H. Matsumoto, S. Kiso, Y. Yoshida, S. Shinzaki, et al., N-Acetylglucosaminyltransferase V regulates TGF-beta response in hepatic stellate cells and the progression of steatohepatitis, *Glycobiology* 22 (2012) 778–787, <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cws012>.
- D.E. Frances, O. Motino, N. Agra, A. Gonzalez-Rodriguez, A. Fernandez-Alvarez, C. Cucarella, et al., Hepatic cyclooxygenase-2 expression protects against diet-induced steatosis, obesity, and insulin resistance, *Diabetes* 64 (2015) 1522–1531, <http://dx.doi.org/10.2337/db14-0979>.
- O. Motino, N. Agra, R. Brea Contreras, M. Domínguez-Moreno, C. García-Monzón, J. Vargas-Castrillon, et al., Cyclooxygenase-2 expression in hepatocytes attenuates non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in mice, *Biochim. Biophys. Acta* 1862 (2016) 1710–1723, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.06.009>.
- M. Casado, B. Mollá, R. Roy, A. Fernández-Martínez, C. Cucarella, R. Mayoral, et al., Protection against Fas-induced liver apoptosis in transgenic mice expressing cyclooxygenase 2 in hepatocytes, *Hepatology* 45 (2007) 631–638, <http://dx.doi.org/10.1002/hep.21556>.
- V.G. Trusca, E.V. Fuior, I.C. Florea, D. Kardassis, M. Simionescu, A.V. Gafencu, Macrophage-specific up-regulation of apolipoprotein E gene expression by STAT1 is achieved via long range genomic interactions, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 13891–13904, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.179572>.
- I. Mederacke, D.H. Dapito, S. Aflo, H. Uchinami, R.F. Schwabe, High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers, *Nat. Protoc.* 10 (2015) 305–315, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015.017>.
- O. Motino, D.E. Frances, R. Mayoral, L. Castro-Sánchez, M. Fernández-Velasco, L. Bosca, et al., Regulation of MicroRNA 183 by cyclooxygenase 2 in liver is DEAD-box helicase p68 (DDX5) dependent: role in insulin signaling, *Mol. Cell. Biol.* 35 (2015) 2554–2567, <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00198-15>.

- 29 J.B. Chakraborty, F. Oakley, M.J. Walsh, Mechanisms and biomarkers of apoptosis in liver disease and fibrosis, *Int. J. Hepatol.* 2012 (2012) 648915, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/648915>.
- 30 X. Chen, Y. Zhao, F. Wang, Y. Bei, J. Xiao, C. Yang, MicroRNAs in liver regeneration, *Cell. Physiol. Biochem.* 37 (2015) 615–628, <http://dx.doi.org/10.1159/000430381>.
- 31 C. Roderburg, C. Trautwein, Cell-specific functions of miRNA in the liver, *J. Hepatol.* 66 (2017) 655–656, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.09.015>.
- 32 J. Wang, E.S. Chu, H.Y. Chen, K. Man, M.Y. Go, X.R. Huang, et al., microRNA-29b prevents liver fibrosis by attenuating hepatic stellate cell activation and inducing apoptosis through targeting PI3K/AKT pathway, *Oncotarget* 6 (2015) 7325–7338, <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.2621>.
- 33 M.K. Knabel, K. Ramachandran, S. Karhadkar, H.W. Hwang, T.J. Creamer, R.R. Chivukula, et al., Systemic delivery of scAAV8-encoded MiR-29a ameliorates hepatic fibrosis in carbon tetrachloride-treated mice, *PLoS One* 10 (2015) e0124411, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0124411>.
- 34 A. Diaz, J. Varga, S.A. Jimenez, Transforming growth factor-beta stimulation of lung fibroblast prostaglandin E2 production, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 11554–11557.
- 35 S. Cagnol, J.C. Chambard, ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death—apoptosis, autophagy and senescence, *FEBS J.* 277 (2010) 2–21, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07366.x>.
- 36 K. Dzobo, V.D. Leaner, M.I. Parker, Feedback regulation of the $\alpha 2(1)$ collagen gene via the Mek-Erk signaling pathway, *IUBMB Life* 64 (2012) 87–98, <http://dx.doi.org/10.1002/iub.568>.
- 37 X. Gao, Y. Cao, W. Yang, C. Duan, J.F. Aronson, C. Rastellini, et al., BMP2 inhibits TGF-beta-induced pancreatic stellate cell activation and extracellular matrix formation, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 304 (2013) G804–13, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00306.2012>.
- 38 N. Kimura, R. Matsuo, H. Shibuya, K. Nakashima, T. Taga, BMP2-induced apoptosis is mediated by activation of the TAK1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by Smad6, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 17647–17652, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M908622199>.
- 39 C.L. Lino Cardenas, I.S. Henaoui, E. Courcot, C. Roderburg, C. Cauffiez, S. Aubert, et al., miR-199a-5p is upregulated during fibrogenic response to tissue injury and mediates TGFbeta-induced lung fibroblast activation by targeting caveolin-1, *PLoS Genet.* 9 (2013) e1003291, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1003291>.
- 40 D. Gvaranua, M.E. Blaauboer, R. Hanemaaijer, V. Everts, Role of caveolin-1 in fibrotic diseases, *Matrix Biol.* 32 (2013) 307–315, <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2013.03.005>.
- 41 S.N. Hartland, F. Murphy, R.L. Aucott, A. Abergel, X. Zhou, J. Waung, et al., Active matrix metalloproteinase-2 promotes apoptosis of hepatic stellate cells via the cleavage of cellular N-cadherin, *Liver Int.* 29 (2009) 966–978, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1478-3231.2009.02070.x>.
- 42 B. Sun, X. Zhang, X. Cheng, Y. Zhang, L. Chen, L. Shi, et al., Intratumoral hepatic stellate cells as a poor prognostic marker and a new treatment target for hepatocellular carcinoma, *PLoS One* 8 (2013) e80212, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0080212>.