

Departamento de Ciencias Biomédicas

Área de Fisiología

EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA AUTOFAGIA, EL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO Y LA APOPTOSIS EN EL FALLO HEPÁTICO AGUDO INDUCIDO POR EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CONEJO

"EFFECTS OF MELATONIN ON AUTOPHAGY, ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS AND APOPTOSIS IN THE ACUTE HEPATIC FAILURE INDUCED BY THE RABBIT HEMORRHAGIC DISEASE VIRUS"



Memoria que presenta la Licenciada Daniela Vallejo Guerra para la obtención del grado de Doctora por la Universidad de León

León, 2014



INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Los Dres. Dña. Mª Jesús Tuñón González y D. Marcelino Álvarez Martínez, directores de la Tesis Doctoral titulada "EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA AUTOFAGIA, EL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO Y LA APOPTOSIS EN EL FALLO HEPÁTICO AGUDO INDUCIDO POR EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CONEJO" realizada por la Lcda. Dña.Daniela Vallejo Guerra, en el programa de doctorado de Biomedicina, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firman, en León a _____ de _____ de 2014.

Los directores de la Tesis Doctoral

Fdo.: Dra. Mª Jesús Tuñón González Fdo.: Dr. Marcelino Álvarez Martínez



ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO

El órgano responsable del programa de doctorado de Biomedicina en su reunión celebrada el día ______ de ______ de 2014 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada "EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA AUTOFAGIA, EL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO Y LA APOPTOSIS EN EL FALLO HEPÁTICO AGUDO INDUCIDO POR EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CONEJO", dirigida por los Dres. Dña. Mª Jesús Tuñón González y D. Marcelino Álvarez Martínez, y elaborada por la Lcda. Daniela Vallejo Guerra, cuyo título en inglés es "Effects of melatonin on autophagy, endoplasmic reticulum stress and apoptosis in the acute hepatic failure induced by the rabbit hemorrhagic disease virus".

Lo que firmo, en León a _____ de _____ de 2014.

El Director del Dpto.

La Secretaria del Dpto.

Fdo: Dr. Juan José García Viéitez

Fdo: Dra. Pilar Sánchez Collado

A mis padres y a Manuel

The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not 'Eureka!' but 'That's funny...' Isaac Asimov

Agradecimientos

En la palabra "complicado", con sus cuatro sílabas y diez letras, apenas cabe la intención de explayarme en cuanto a agradecimientos se refiere; tan sólo tardaréis unos segundos en leer lo que para mí es temporalmente infinito.

En primer lugar me gustaría agradecer a los directores de esta Tesis, la Dra. Mª Jesús Tuñón González y el Dr. Marcelino Álvarez Martínez, su dedicación, confianza, paciencia, apoyo y amistad depositados en mí durante este tiempo. Por abrirme las puertas, y darme la oportunidad de realizar una Tesis cuando la idea de convertirme en doctora pasó por mi cabeza.

A continuación, agradezco al Dr. Javier González Gallego, director del Instituto de Biomedicina de la Universidad de León, la seguridad depositada en este proyecto y su inestimable ayuda a la hora de llevarlo a cabo.

Agradezco también a todos los compañeros del Área de Fisiología del Departamento de Ciencias Biomédicas, que me han acompañado durante estos años, su amabilidad, consejos y disponibilidad siempre que lo he necesitado.

Gracias de todo corazón a toda la gente del IBIOMED: Susana, Juancho, Raquel, Vicky, Sandra, Anna, Paula y Néstor, por hacer más llevadero el trabajo diario, por su simpatía, interés e imprescindible ayuda. A Raque y Sara, que aunque hayan abandonado el nido, siguen formando parte de este lugar y de este trabajo; por su amistad, compañía y desparpajo. A Ángel y a las chicas de Carmen Marín, Marta, Sandra, Natalia y Laura, que más que un apoyo han sido mis ganas, mi distracción, mi desahogo, mis buenos ratos y mis sumideros de crisis espontáneas.

To everybody in AG Cantz, especially to Amar and Tobias, for considering me as a member from the first day, for their help in the lab, their aptitude and kindness. Danke schön!

Por supuesto, quiero agradecer a mis compañeras de guerra en la trinchera, Irene y Bea, el haberme enseñado a lidiar con la ciencia a base de artillería pesada. Gracias por vuestras grandes dosis de paciencia empleadas en el día a día, por hacer posible un viaje en zodiac a la Luna desde una isla desierta, por las millones de carcajadas compartidas y por haber sido compañeras en esta aventura que no hubiera sido posible sin vosotras.

Gracias, en especial a Nané, cómplice de desventuras en el laboratorio y fuera de él. Por tu tesón, constancia y tenacidad. Por hacerme ver, a través de cafés y cañas, que el mundo es un tejado donde nos podemos sentar a contemplar la vida sin prisa pero sin pausa. Gracias por todo lo que me has enseñado, por tu inteligencia, espontaneidad y por darme el lujo de poder llamarte amiga. A mis compañeros de piso, que rápidamente comprendieron que la ciencia no entiende de horarios, y yo tampoco. Jessi, Cris, Sasi, gracias por compartir conmigo mucho más que un techo.

A toda la gente que conocí en Granada, en especial a los afortunados que pudimos disfrutar de la Amapola, y a mis compañeros de la Facultad de Ciencias. Nélida, Lina, Miguel, Poyato, Pepe, Mª Rosa, Lourdes, Lidia, Natalia, gracias por vuestra eterna amistad.

Gracias a toda la gente de León, que ha hecho que me sienta como en casa: Dani, Fofy, Lala, Kike, Ana, Lux, Elena. A Caste y a Chenco, por arrimar el hombro desde nuestras andanzas en las Sanchas. A mi Caraja, compañero en la distancia, por su despiste extremo, su nobleza, y disponibilidad. A Chema, por su autenticidad y su contagiosa calma. A mis amigos de Minas, por no dejarme perder el contacto con la vida universitaria ni un solo año, por preocuparos por mi labor científica y acompañarme a lo largo de este tiempo, gracias a todos.

A Isa, por haber empezado esta maratón conmigo en Biología, por haberme enseñado tantas cosas, y por sentirte cerca aunque sea Austin y no yo quien disfruta de tu compañía.

A Reyes y a la familia Toca Romero, por su interés y fe en mí. Gracias a Elena y a su forma de entender la vida, porque con ella las mentiras son verdades, y las espinas se convierten en un tren de aterrizaje. A Estela y su pasión por los Swarovski. A Ana y Ángela, por hacerme acabar siempre con agujetas de tanto reirnos y ser un impulso más en este largo proyecto. A mi Helen, que tantas horas de sueño le debo, por su entusiasmo, su complicidad y por formar parte de este equipo sin saber qué es una pipeta. A Sarita, mi vecina del alma, por estar siempre ahí desde tiempos inmemorables.

A Mikel, porque sin querer te has llevado lo mejor y lo peor de la tesis. Un eterno gracias por haber sabido manejar la situación y por animarme siempre con tanto aplomo.

A Pipía, Andrea y Celia Carrión, por su afecto, cariño y apoyo desde mis primeros recuerdos. Gracias.

Por último, quiero agradecer a mi familia, en especial a mis padres, el apoyo que siempre he recibido en todas las decisiones que he tomado. No sabéis lo afortunada y orgullosa que me siento. A la familia Vallejo por su frescura, optimismo y cariño. Abuelos y tíos de la familia Guerra, gracias por confiar en mí, batallar conmigo y haberme dado la oportunidad de empezar, y ahora terminar, este proyecto.

A todos vosotros, gracias. Esta tesis también es vuestra.

Parte de los resultados recogidos en la presente memoria han dado lugar a las siguientes:

Publicaciones:

Vallejo D, Crespo I, San Miguel B, Álvarez M, Prieto J, Tuñón MJ, González-Gallego J. Autophagic response in the Rabbit Hemorrhagic Disease, an animal model of virally-induced fulminant hepatic failure. *Vet Res* 2014; 45:15.

San-Miguel B, Crespo I, Vallejo D, Álvarez M, Prieto J, González-Gallego J, Tuñón MJ. Melatonin modulates the autophagic response in acute liver failure induced by the rabbit hemorrhagic disease virus. *J Pineal Res* 2014; 56:313-21.

Tuñón MJ, San-Miguel B, Crespo I, Laliena A, Vallejo D, Álvarez M, Prieto J, Gónzalez-Gallego J. Melatonin treatment reduces endoplasmic reticulum stress and modulates the unfolded protein response in rabbits with letal fulminant hepatitis of viral origin. *J Pineal Res* 2013; 55:221-8.

Comunicaciones a congresos:

Crespo I, San-Miguel B, Vallejo D, Alonso B, Culebras JM, Ortiz J, González-Gallego J, Tuñón MJ. "La glutamina disminuye la autofagia en un modelo animal de enfermedad inflamatoria intestinal". XXIX Congreso de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral (SENPE). Murcia, España. 15-17 de mayo, 2014.

Nutrición Hospitalaria 2014; 29:45-46.

San-Miguel B, Vallejo D, Crespo I, Álvarez M, Prieto J, Tuñón MJ, Gónzalez-Gallejo J. "Estudio de la respuesta autofágica en la enfermedad hemorrágica del conejo, un modelo animal de fallo hepático fulminante". XXXIX Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). Madrid, España. 18-21 de febrero, 2014.

Gastroenterología y Hepatología 2014; 37:29-30.

Vallejo D, San-Miguel B, Laliena A, Crespo I, Ortiz J, Culebras JM, González-Gallego J, Tuñón MJ. "El virus de la enfermedad hemorrágica del conejo, modelo animal de hepatitis fulminante, induce autofagia". XIX Congreso de la Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas. Madrid, España. 21-22 de octubre, 2013.

British Journal of Surgery 2013; 101:13-14.

Crespo I, San-Miguel B, Vallejo D, Laliena A, Ortiz J, Culebras JM, González-Gallego J, Tuñón MJ. "Papel de la autofagia en la enfermedad inflamatoria intestinal: estudio en un modelo animal de colitis". XIX Congreso de la Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas. Madrid, España. 21-22 de octubre, 2013.

British Journal of Surgery 2013; 101:3-4.

Crespo I, San Miguel B, Laliena A, Vallejo D, Riezu-Boj JI, Larrea E, Álvarez M, González-Gallego J, Prieto J, Tuñón MJ. "Caracterización de un modelo de hepatitis vírica crónica en conejos". XXXVIII Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). Madrid, España. 20-22 de febrero, 2013.

Gastroenterología y Hepatología 2013; 36:84-85.

Vallejo D, San-Miguel B, Crespo I, Laliena A, Culebras JM, González-Gallego J, Tuñón MJ. "Implicación de las diferentes vías de señalización de la respuesta inflamatoria en un modelo animal de hepatitis fulminante". XVIII Congreso de la Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas. León, España. 18-19 de octubre, 2012. Premio al mejor poster.

British Journal of Surgery 2013; 100:1-20.

Laliena A, San-Miguel B, Crespo I, Vallejo D, Álvarez M, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. "Melatonin attenuates inflammation and promotes regeneration in rabbits with fulminant hepatitis of viral origin." 25th SIS-Europe Congress on Surgical Infections. Lund, Suecia. 14-16 de junio, 2012.

Surgical Infections 2012; 13:A-11.

San-Miguel B, Laliena A, Crespo I, Vallejo D, Jorquera F, Álvarez M, González-Gallego J, Tuñón MJ. "La melatonina reduce la inflamación y promueve la regeneración hepática en conejos con fallo hepático agudo de origen vírico." XXXVII CONGRESO ANUAL de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). Madrid, España. 15-17 de febrero, 2012.

Gastroenterología y Hepatología 2012; 35:143.

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AMC	7-amino-4-metilcumarina
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNip	ARN de interferencia pequeño
ASB	albúmina sérica bovina
ATF	factor activador de la transcripción
Atg	gen relacionado con la autofagia
ASK1	quinasa 1 reguladora de la señal apoptótica
Bcl-2	gen del linfoma de células B2
Bcl-xL	proteína antiapoptótica de la familia Bcl-2
BiP	proteína de unión a inmunoglobulinas
СНОР	proteína de unión a elementos CCAAT
CID	coagulación intravascular diseminada
Cit-c	citocromo c
CVB3	coxackievirus B3
dNTP	desoxinucleótido trifosfato
DENV	virus del Dengue
DEPC	dietilpirocarbonato
EDTA	ácido etilén diamino tetraacético
EEM	error estándar de la media
EH	encefalopatía hepática
$eIF2\alpha$	subunidad alfa del factor 2 iniciador de la traducción eucariótico
ERAD	genes relacionados con la degradación asociada al RE
FHF	fallo hepático fulminante
FIP200	proteína de 200 kDa de interacción con la familia de las quinasas de adhesión
GADD34	gen inducible por daño en el ADN y detección del crecimiento

GR	glutatión reductasa
GSH	glutatión (forma reducida)
GSSG	disulfuro de glutatión (forma oxidada)
GRP	proteína regulada por glucosa
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico
hpi	horas postinfección
IL	interleucina
IRE1	enzima dependiente de inositol
JNK	quinasa N-terminal de c-Jun
LAMP	proteína de la membrana lisosomal
LC3	proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3
MET	microscopía electrónica de transmisión
mTOR	diana de rapamicina en células de mamífero
mTORC	complejo de mTOR
NF-κB	factor de transcripción nuclear kappaB
OPT	o-ftalaldehído
p62/SQSTM1	proteína p62 o sequestrosoma-1
PARP-1	poli-adenosín difosfato-ribosa-polimerasa-1
PBS	tampón fosfato salino
PE	fosfatidiletanolamina
PERK	proteína quinasa dependiente de ARN como quinasa del RE
РІЗК	quinasa fosfatidil inositol-3
PI3P	fosfatidil inositol-3-fosfato
PIC	presión intracraneal
PKR	proteína quinasa R
PSA	persulfato amónico
RE	retículo endoplasmático
RHD	enfermedad hemorrágica del conejo
VRHD	virus de la RHD

RIPA	tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación
RL	radical libre
RT-PCR	transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
SDS	dodecil sulfato sódico
SSF	solución salina fisiológica
SV	virus Sindbis
TEMED	tetrametiletilendiamina
TGF-β	factor de crecimiento transformante-beta
ТН	trasplante hepático
TNF-α	factor de necrosis tumoral-alfa
ТР	tiempo de protrombina
TRAF2	factor 2 asociado al receptor de TNF
ULK	quinasas tipo Unc-51 1 y 2
UPR	respuesta a proteínas mal plegadas
UVRAG	gen asociado a la resistencia a la radiación ultravioleta
VEV	virus de la estomatitis vesicular
VHA	virus de la hepatitis A
VHB	virus de la hepatitis B
VHC	virus de la hepatitis C
VHD	virus de la hepatitis D
VHE	virus de la hepatitis E
VHM	virus de la hepatitis murina
VHS	virus del herpes simple
VIH-1	virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
VP60	proteína viral estructural mayoritaria de 60 kDa
Vps34	proteína de clasificación vacuolar 34 de humanos
XBP1	proteína 1 de unión a la caja X
XBP1s	splicing de XBP1

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 2.1 El fallo hepático fulminante	7 9
2.1.1 Etiología	9
2.1.2 Clínica	11
2.1.3 Anatomía patológica	
2.1.4 Diagnóstico	20
2.1.5 Clasificación	20
2.1.6 Tratamiento	22
2.2 Modelos animales de fallo hepático fulminante	27
2.2.1 Modelos quirúrgicos	28
2.2.1.1 Hepatectomía total y parcial	28
2.2.1.2 Desvascularización	29
2.2.2 Modelos inducidos por sustancias químicas	29
2.2.3 WIODEIOS VIRICOS	31
2.2.3 Modelos Viricos 2.3 La enfermedad hemorrágica del conejo como modelo a hepático fulminante	31 Inimal de fallo 32
2.2.3 Modelos viricos 2.3 La enfermedad hemorrágica del conejo como modelo a hepático fulminante 2.3.1 Etiología	
 2.2.3 Modelos Viricos	31 Inimal de fallo 32 33 34 34 35 36 36
 2.2.3 Modelos Viricos	
 2.2.3 Modelos Viricos	31 Inimal de fallo
 2.3 Modelos Víricos 2.3 La enfermedad hemorrágica del conejo como modelo a hepático fulminante. 2.3.1 Etiología. 2.3.2 Patogenia. 2.3.2 Patogenia. 2.3.3 Cuadro clínico 2.3.4 Lesiones. 2.3.4.1 Macroscópicas. 2.3.4.2 Microscópicas. 2.4.1 La apoptosis. 	31 Inimal de fallo
 2.2.3 Modelos Viricos. 2.3 La enfermedad hemorrágica del conejo como modelo a hepático fulminante. 2.3.1 Etiología. 2.3.2 Patogenia. 2.3.2 Patogenia. 2.3.3 Cuadro clínico . 2.3.4 Lesiones. 2.3.4.1 Macroscópicas. 2.3.4.2 Microscópicas. 2.4.1 La apoptosis. 2.4.1.1 Vías de la apoptosis. 	31 Inimal de fallo 32 33 33 34 35 36 36 36 37 38 38 38 38 38
 2.2.3 Modelos viricos 2.3 La enfermedad hemorrágica del conejo como modelo a hepático fulminante. 2.3.1 Etiología. 2.3.2 Patogenia. 2.3.3 Cuadro clínico 2.3.4 Lesiones. 2.3.4.1 Macroscópicas. 2.3.4.2 Microscópicas. 2.4.1 La apoptosis. 2.4.1.1 Vías de la apoptosis. 2.4.1.2 Familia Bcl-2. 	31 Inimal de fallo 32 33 33 34 34 35 36 36 37 38 38 38 40 40 42
 2.3. Modelos viricos 2.3. La enfermedad hemorrágica del conejo como modelo a hepático fulminante. 2.3.1 Etiología. 2.3.2 Patogenia. 2.3.2 Patogenia. 2.3.3 Cuadro clínico	31 Inimal de fallo

2.4.2 El estrés del retículo endoplasmático45
2.4.2.1 Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)45
2.4.2.2 Estrés del retículo endoplasmático y apoptosis49
2.4.3 Autofagia. Mecanismo de adaptación frente al estrés celular
2.4.3.1 Tipos de autofagia53
2.4.3.2 La maquinaria autofágica54
2.4.3.3 Vías de señalización implicadas en la regulación de la autofagia60
2.5 El papel de la autofagia en la infección viral
2.5.1 Regulación del mecanismo autofágico por infección viral
2.5.1.1 Inducción de la formación de vesículas autofágicas en células infectadas
2.5.1.2 Inhibición de la maduración de vesículas autofágicas en células infectadas67
2.5.2 Función antiviral de la autofagia67
2.5.2.1 La autofagia como un mecanismo intrínseco celular que inhibe la replicación viral y/o elimina a los virus de células infectadas68
2.5.2.2 La autofagia como un mecanismo de supervivencia en la infección
2.5.2.3 La autofagia como mecanismo de evasión viral69
2.5.3 Función proviral de la autofagia70
2.5.3.1 La autofagia participa en la biogénesis viral71
2.5.3.2 La autofagia promueve la liberación viral72
2.5.3.3 La autofagia colabora en la traducción de ARN72
2.6 La melatonina
2.6.1 Estructura y metabolismo de la melatonina74
2.6.2 Funciones de la melatonina76
2.6.3 La melatonina y el hígado78
3 MATERIAL Y MÉTODOS
3 MATERIAL Y MÉTODOS
3 MATERIAL Y MÉTODOS
3 MATERIAL Y MÉTODOS813.1 Material833.2 Soluciones843.3 Animales843.4 Diseño experimental84
3 MATERIAL Y MÉTODOS. 81 3.1 Material 83 3.2 Soluciones 84 3.3 Animales 84 3.4 Diseño experimental 84 3.4.1 Obtención del inóculo vírico 84

3.4.3 Inoculación de los animales y grupos experimentales
3.4.4 Recogida de muestras88
3.5 Métodos analíticos
3.5.1 Determinaciones en hígado88
3.5.1.1 Obtención de homogeneizado total88
3.5.1.2 Obtención de las fracción nuclear88
3.5.1.3 Concentración de proteína89
3.5.1.4 Concentración de glutatión reducido (GSH)90
3.5.1.5 Concentración de glutatión oxidado (GSSG)90
3.5.1.6 Western blot91
3.5.1.7 Microscopía electrónica de transmisión93
3.5.1.8 Extracción, purificación y cuantificación del ARN94
3.5.1.9 Tratamiento del ARN con ADN-asas95
3.5.1.10 Reacción de la transcriptasa reversa96
3.5.1.11 Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real (RT-PCR)
3.5.1.12 Estudio inmunohistoquímico99
3.5.1.13 Doble inmunofluorescencia99
3.5.1.14 Actividad de la caspasa 3100
3.5.2 Tratamiento estadístico101
4 RESULTADOS
4.1.1 Expresión de la proteína viral de la cápside VP60
4.1.2 Detección de vesículas autofágicas en hepatocitos infectados por el VRHD mediante microscopía electrónica de transmisión
4.1.3 Efecto del VRHD sobre diversos marcadores de la respuesta autofágica107
4.1.4 Importancia del estrés del RE en la respuesta autofágica inducida por el VRHD.114
4.1.5 Importancia de la apoptosis hepática en la respuesta autofágica inducida por el VRHD116
4.2 Efecto de la melatonina sobre la respuesta autofágica inducida por el VRHD
4.2.1 Efecto de la melatonina sobre marcadores de estrés oxidativo asociados a la respuesta autofágica inducida por el VRHD119

4.2.2 Efecto de la melatonina sobre la expresión de la proteína viral de la cápside VP60 120
4.2.3 Efecto de la melatonina sobre diversos marcadores de la respuesta autofágica inducida por el VRHD122
4.2.4 Efecto de la melatonina sobre el estrés del RE asociado a la respuesta autofágica inducida por el VRHD127
4.2.5 Efecto de la melatonina sobre la apoptosis hepática asociada a la respuesta autofágica inducida por el VRHD129
4.3 Efecto de la melatonina sobre el estrés del RE y la apoptosis en el modelo de FHF inducido por el VRHD130
5 DISCUSIÓN
5.1 Efecto del VRHD sobre la respuesta autofágica141
5.1.1 Expresión de la proteína viral de la cápside VP60
5.1.2 Detección de vesículas autofágicas en hepatocitos infectados por el VRHD mediante microscopía electrónica de transmisión141
5.1.3 Efecto del VRHD sobre diversos marcadores de la respuesta autofágica142
5.1.4 Importancia del estrés del RE en la respuesta autofágica inducida por el VRHD.145
5.1.5 Importancia de la apoptosis hepática en la respuesta autofágica inducida por el VRHD145
5.2 Efecto de la melatonina sobre la respuesta autofágica inducida por el VRHD 147
5.2.1 Efecto de la melatonina sobre marcadores de estrés oxidativo asociados a la respuesta autofágica inducida por el VRHD147
5.2.2 Efecto de la melatonina sobre la expresión de la proteína viral de la cápside VP60 148
5.2.3 Efecto de la melatonina sobre diversos marcadores de la respuesta autofágica inducida por el VRHD148
5.2.4 Efecto de la melatonina sobre el estrés del RE asociado a la respuesta autofágica inducida por el VRHD150
5.2.5 Efecto de la melatonina sobre la apoptosis hepática asociada a la respuesta autofágica inducida por el VRHD151
5.3 Efecto de la melatonina sobre el estrés del RE y la apoptosis en el modelo de FHF inducido por el VRHD152
6 CONCLUSIONES
7 SUMMARY

7.1 Introduction and objectives
7.2 Materials and methods
7.2.1 Virus and experimental model165
7.2.2 Samples collection167
7.2.3 Measurement of reduced and oxidised glutathione167
7.2.4 Western blot analysis168
7.2.5 Transmission Electron Microscopy169
7.2.6 Real-time RT-PCR170
7.2.7 Immunohistochemistry170
7.2.8 Double immunofluorescence170
7.2.9 Caspase 3 activity171
7.2.10 Statistical analysis171
7.3 Results
7.3.1 Effects of RHDV on autophagic response173
7.3.1.1 Expression of the viral capsid protein VP60173
7.3.1.2 Detection of autophagic vesicles in RHDV-infected hepatocytes by transmission electron microscopy
7.3.1.3 Effects of RHDV-infection on diverse autophagic markers
7.3.1.4 Significance of ER stress in RHDV-induced autophagy176
7.3.1.5 Significance of hepatic apoptosis in RHDV-induced autophagy176
7.3.2 Effect of melatonin on the autophagic response induced by RHDV-infection177
7.3.2.1 Effect of melatonin on oxidative stress markers associated to RHDV-induced autophagy
7.3.2.2 Effect of melatonin on the viral capsid protein VP60 expression
7.3.2.3 Effect of melatonin on diverse markers of RHDV-induced autophagy178
7.3.2.4 Effect of melatonin on ER stress associated to RHDV-induced autophagy179
7.3.2.5 Effect of melatonin on hepatic apoptosis associated to RHDV-induced autophagy180
7.3.3 Effect of melatonin on ER stress and apoptosis in a FHF model induced by RHDV
7.4 Discussion
7.4.1 Effects of RHDV on autophagic response183
7.4.1.1 Expression of the viral capsid protein VP60183

7.4.1.2 Dectection of autophagic vesicles in RHDV-infected hepatocytes by transmission electron microscopy
7.4.1.3 Effects of RHDV-infection on diverse autophagic markers
7.4.1.4 Significance of ER stress in RHDV-induced autophagy186
7.4.1.5 Significance of hepatic apoptosis in RHDV-induced autophagy187
7.4.2 Effect of melatonin on the autophagic response induced by RHDV-infection188
7.4.2.1 Effect of melatonin on oxidative stress markers associated to RHDV-induced autophagy
7.4.2.2 Effect of melatonin on the viral capsid protein VP60 expression
7.4.2.3 Effect of melatonin on diverse markers of RHDV-induced autophagy190
7.4.2.4 Effect of melatonin on ER stress associated to RHDV-induced autophagy191
7.4.2.5 Effect of melatonin on hepatic apoptosis associated to RHDV-induced autophagy192
7.4.3 Effect of melatonin on ER stress and apoptosis in a FHF model induced by RHDV
8 CONCLUSIONS197
9 BIBLIOGRAFÍA

Figura 1. Etiología del FHF10
Figura 2. Afectaciones sistémicas del fallo hepático13
Figura 3. Necrosis masiva del hígado, con ingurgitación sanguínea de sinusoides y proliferación de conductillos
Figura 4. Apariencia real y esquema del funcionamiento del sistema de recirculación con adsorbentes moleculares, MARS
Figura 5. Organización genómica del VRHD
Figura 6. Diferencias entre la muerte celular por necrosis y por apoptosis
Figura 7. Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis41
Figura 8. Señalización de los miembros de la familia Bcl-2
Figura 9. Repuesta a proteínas mal plegadas (UPR)46
Figura 10. Vía de señalización de PERK47
Figura 11. Vía de señalización de IRE148
Figura 12. Vía de señalización de ATF649
Figura 13. Apoptosis inducida por estrés del RE50
Figura 14. Diferentes tipos de autofagia53
Figura 15. Circuito molecular y vías de señalización que regulan la autofagia55
Figura 16. Regulación de la autofagia a través de los complejos ULK56
Figura 17. Complejos de las fosfatidil inositol-3 quinasas de clase III
Figura 18. Conjugación de los complejos tipo ubiquitina58
Figura 19. Procesado de LC359
Figura 20. Fusión del autofagosoma con el lisosoma60
Figura 21. Regulación de la autofagia mediante nutrientes
Figura 22. Autofagia mediada por el estrés del RE63
Figura 23. Inhibición de la autofagia por miembros de la familia Bcl-265
Figura 24. Modulación de la autofagia en células infectadas por diversos virus
Figura 25. Modulación de la autofagia por distintos virus
Figura 26. Función proviral de la autofagia71
Figura 27. La autofagia promueve la liberación viral72
Figura 28. Biosíntesis de la melatonina75

Figura 29	Titulación del VRHD por la técnica de hemoaglutinación	. 85
Figura 30	Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa	. 97
Figura 31	Expresión relativa de ARNm de VP60	105
Figura 32	Detección inmunohistoquímica de VP60	106
Figura 33	Microfotografías electrónicas de las secciones hepáticas	107
Figura 34	Expresión relativa de ARNm de Atg12-Atg5-Atg16L1	108
Figura 35	Expresión relativa de ARNm de Beclina-1	109
Figura 36	Expresión relativa de ARNm de UVRAG	110
Figura 37	Detección inmunohistoquímica de VP60	111
Figura 38	Expresión hepática de LC3I/II	112
Figura 39	Expresión relativa de ARNm de p62/SQSTM1	113
Figura 40	Expresión hepática de p62/SQSTM1	113
Figura 41	Expresión hepática de mTOR y de su forma fosforilada, p-mTOR	114
Figura 42	Expresión relativa de ARNm de BiP, CHOP y GRP94	115
Figura 43	Actividad hepática de la caspasa 3	116
Figura 44	Expresión hepática de PARP-1	117
Figura 45	Expresión hepática de Bcl-2 y Bcl-xL	118
Figura 46	Relación hepática GSSG/GSH	120
Figura 47	Expresión relativa de ARNm de VP60	121
Figura 48	Detección inmunohistoquímica de VP60	121
Figura 49	Expresión relativa de ARNm de Atg12-Atg5-Atg16L1	123
Figura 50		
	Expresión relativa de ARNm de Beclina-1	124
Figura 51	Expresión relativa de ARNm de Beclina-1	124 125
Figura 51 Figura 52	Expresión relativa de ARNm de Beclina-1 Expresión hepática de la relación LC3-I y LC3-II Imágenes de la doble inmunofluorescencia para LC3 y LAMP-1	124 125 126
Figura 51 Figura 52 Figura 53	Expresión relativa de ARNm de Beclina-1 Expresión hepática de la relación LC3-I y LC3-II Imágenes de la doble inmunofluorescencia para LC3 y LAMP-1 Expresión relativa de ARNm de p62/SQSTM1	124 125 126 127
Figura 51 Figura 52 Figura 53 Figura 54	Expresión relativa de ARNm de Beclina-1 Expresión hepática de la relación LC3-I y LC3-II Imágenes de la doble inmunofluorescencia para LC3 y LAMP-1 Expresión relativa de ARNm de p62/SQSTM1 Expresión relativa de ARNm de CHOP y de BiP	124 125 126 127 128
Figura 51 Figura 52 Figura 53 Figura 54 Figura 55	Expresión relativa de ARNm de Beclina-1 Expresión hepática de la relación LC3-I y LC3-II Imágenes de la doble inmunofluorescencia para LC3 y LAMP-1 Expresión relativa de ARNm de p62/SQSTM1 Expresión relativa de ARNm de CHOP y de BiP Actividad hepática de la caspasa 3	124 125 126 127 128 129
Figura 51 Figura 52 Figura 53 Figura 54 Figura 55 Figura 56	Expresión relativa de ARNm de Beclina-1 Expresión hepática de la relación LC3-I y LC3-II Imágenes de la doble inmunofluorescencia para LC3 y LAMP-1 Expresión relativa de ARNm de p62/SQSTM1 Expresión relativa de ARNm de CHOP y de BiP Actividad hepática de la caspasa 3	124 125 126 127 128 129 130
Figura 51 Figura 52 Figura 53 Figura 54 Figura 55 Figura 56 Figura 57	Expresión relativa de ARNm de Beclina-1 Expresión hepática de la relación LC3-I y LC3-II Imágenes de la doble inmunofluorescencia para LC3 y LAMP-1 Expresión relativa de ARNm de p62/SQSTM1 Expresión relativa de ARNm de CHOP y de BiP Actividad hepática de la caspasa 3 Expresión hepática de PARP-1	124 125 126 127 128 129 130

Figura 59. Expresión hepática de la quinasa JNK y de su forma fosforilada, p-JNK	134
Figura 60. Expresión hepática de la caspasa 12	135
Figura 61. Expresión hepática de ATF6 α y de CHOP	136
Figura 62. Expresión hepática de p-IRE1 y de XBP1s	137
Figura 63. Expresión hepática de BiP, PERK, y de su forma fosforilada, p-PERK	138

Tabla 1. Composición de los diferentes geles de separación.	. 92
Tabla 2. Composición del gel de concentración.	. 92
Tabla 3. Secuencias específicas de los iniciadores utilizados para la RT-PCR	. 98
Tabla 4. Concentraciones hepáticas de GSH y GSSG	119
Tabla 5. Expresión relativa de ARNm de diversos marcadores de estrés del RE	132

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El fallo hepático fulminante (FHF) es un síndrome clínico muy grave asociado a una elevada mortalidad (60-90%), en el que existe una lesión hepática aguda en pacientes sin una enfermedad hepática preexistente conocida, que conduce a una pérdida rápida de la función hepática. Se caracteriza principalmente por trastorno metabólico, ictericia, coagulopatía y encefalopatía hepática (EH). La etiología del FHF puede variar en función de la región geográfica. Las causas más frecuentes en todo el mundo incluyen a las hepatitis virales, particularmente las producidas por los virus de la hepatitis A (VHA) y B (VHB), sobredosis de medicamentos, reacciones idiosincrásicas de fármacos, ingestión de toxinas y alteraciones metabólicas. Además de éstas existen causas indeterminadas que representan una gran proporción de los casos de FHF. Sin embargo, en los últimos años el diagnóstico ha mejorado en gran medida disminuyendo así el número de casos de etiología indeterminada.

El conocimiento de las bases fisiopatológicas y los mecanismos patogénicos involucrados en las alteraciones hemodinámicas, la disfunción inmunológica, y el fallo multiorgánico del FHF es aún muy básico. Por tanto, es necesaria una investigación en mayor profundidad de las bases moleculares del mismo, así como la búsqueda de nuevos tratamientos que al menos aumenten la subsistencia de los pacientes a la espera de un posible trasplante. Además, aunque en los últimos años se han propuesto y aplicado muchas opciones terapéuticas para tratar el FHF, el trasplante hepático (TH) sigue siendo la única terapia efectiva; sin embargo, el procedimiento está limitado por la escasez de donantes de órganos junto con otras dificultades técnicas y de tratamiento, lo que significa que el TH no siempre es una opción.

Por todo esto, otras opciones terapéuticas, como los sistemas de soporte hepático artificiales y bioartificiales, o terapias celulares han de ser consideradas. Estos sistemas por sí solos no tienen efectos significativos en la supervivencia de los pacientes y sólo son propuestos como tratamiento de pacientes con FHF hasta la realización del trasplante. Por tanto, el desarrollo de nuevos modelos animales, experimentalmente reproducibles, que reflejen de un modo adecuado el patrón clínico de la enfermedad humana es absolutamente crucial para mejorar nuestro conocimiento de las alteraciones metabólicas y fisiológicas del síndrome y para facilitar además el desarrollo de nuevas modalidades terapéuticas. Numerosas investigaciones se han llevado a cabo con el fin de desarrollar modelos adecuados de FHF, incluyendo el uso de técnicas quirúrgicas y fármacos hepatotóxicos. Por otra parte, aunque la hepatitis viral sigue siendo una causa importante del mismo en muchas partes del mundo, el uso de agentes infecciosos para inducirlo experimentalmente ha tenido un éxito limitado hasta la fecha.

Nuestro grupo de investigación ha descrito un nuevo modelo animal de FHF producido por la infección experimental de conejos con el virus de la Enfermedad hemorrágica del conejo (VRHD). Éste es un miembro de la familia *Caliciviridae*, que

causa en los conejos una enfermedad altamente mortal, descrita por primera vez en China en 1984. La RHD es una hepatitis vírica que presenta, con algunas hepatitis víricas humanas de tipo fulminante (B, C, y E), un parentesco sorprendente clínico, anatomopatológico y epidemiológico. El virus no afecta a otras especies animales y no se ha señalado hasta la fecha su transmisión al hombre, aún entre las poblaciones más expuestas al virus. Se ha demostrado que el antígeno viral puede encontrarse en los hepatocitos ya a las 12 horas posinfección y que entre las 36 y 48 horas postinfección se localiza en el 60-80% de los hepatocitos. La RHD se caracteriza por alta morbilidad y una mortalidad cercana al 90%. Los conejos mueren en un rango de tiempo definido, entre las 36 y las 54 horas postinfección, con signos clínicos característicos de un FHF progresivo y coma. Además, el intervalo existente desde la infección hasta la muerte de la mayor parte de los conejos aporta una amplia ventana terapéutica que hace que nuestro modelo cumpla con otro de los requisitos imprescindibles: la existencia de un período de tiempo suficiente entre agresión y la muerte para poder investigar adecuadamente las pautas de tratamiento o tecnologías de soporte hepático. Por otra parte, al tratarse de una especie de tamaño pequeño es posible tomar con facilidad muestras seriadas de sangre, monitorizar relativamente de forma sencilla la presión intracraneal y detectar las alteraciones bioquímicas producidas en el curso de la infección. Además, en este modelo se reproducen los parámetros bioquímicos e histológicos y los signos clínicos más representativos del FHF del hombre.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado previamente que, durante la infección experimental con VRHD, la expresión de los genes implicados en las diferentes vías moleculares de daño hepático, la apoptosis y la regeneración cambian significativamente en los últimos periodos de la enfermedad; sin embargo, el mecanismo de infección no ha sido estudiado minuciosamente. Aún se desconocen los mecanismos patogénicos precisos que conducen al desenlace fatal de esta patología y, por otra parte, continúa la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas que al menos aumenten la subsistencia de los pacientes a la espera de un posible trasplante.

La autofagia es un sistema de degradación celular que controla la eliminación y reciclaje de constituyentes intracelulares para el mantenimiento de la supervivencia celular, participando además en la respuesta del hospedador a la infección con el propósito de eliminar patógenos intracelulares. La autofagia desempeña principalmente un papel importante en la supervivencia celular durante la adaptación a condiciones desfavorables de crecimiento o estrés celular. El proceso se inicia con la formación de una membrana de aislamiento denominada fagóforo, que envuelve una pequeña porción de citoplasma, formándose el autofagosoma, vesícula intermediaria de doble membrana que en su interior contiene la carga citoplasmática seleccionada para su degradación. Una vez formado, el autofagosoma se fusiona con el lisosoma para formar un autofagolisosoma donde actúan las proteasas lisosomales que, junto con los transportadores, son los encargados de expulsar al citoplasma los productos de

degradación. Además de su función en el mantenimiento de la homeostasis, la autofagia interviene en la respuesta inmune del hospedador frente a diversas infecciones. Con el fin de contrarrestar este mecanismo, muchos patógenos han evolucionado para evadir, subvertir o explotar la autofagia en su propio beneficio. La inhibición del mecanismo autofágico resulta, en algunas infecciones víricas producidas por el virus Herpes simple (VHS) tipo 1 o de la estomatitis vesicular (VEV), en un aumento de su replicación y virulencia. Sin embargo, otros virus no inhiben la autofagia e impiden la eliminación del contenido intracelular seleccionado previamente con el fin de ser degradado, sino que promueven la síntesis de estructuras autofágicas que en condiciones normales aparecerían en última instancia del proceso. Así, los virus del Dengue (DENV), de la hepatitis C (VHC) y los poliovirus, todos ellos virus ARN positivos, como el VRHD, utilizan la maduración de los autofagosomas para promover su replicación y su liberación. Mientras que los beneficios que cada virus obtiene de interaccionar con las proteínas autofágicas del hospedador son únicos, las semejanzas existentes en los diversos mecanismos de cada virus indican una relación compleja entre estos y las vesículas de degradación celulares del hospedador.

El retículo endoplasmático (RE) es un orgánulo celular esencial para la correcta función y supervivencia celular. Cuando diversos factores, como el acúmulo de proteínas mal plegadas en su lumen, interfieren con su función normal, se produce la activación de la respuesta a estrés del RE a través de la inducción de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), vía de señalización mediante la cual el RE recupera su función. No obstante, si la célula no consigue adaptarse mediante esta vía al estrés del orgánulo, se desencadena la apoptosis en los hepatocitos contribuyendo de forma importante en la fisiopatología del FHF. Numerosos estudios relacionan el estrés del RE con la apoptosis, indicando además que la muerte celular apoptótica puede ser reducida a través de la atenuación del estrés del RE. En diversos modelos de FHF se ha puesto de manifiesto la muerte masiva de hepatocitos por apoptosis, siendo ésta la primera respuesta celular ante los principales daños. El estrés del RE, una de las respuestas típicas de estrés iniciada en las células tras una infección viral, es un mecanismo importante en el mantenimiento de la fisiología de las células sanas cuyo objetivo es disminuir la síntesis de proteínas a través de la UPR. Se ha demostrado que la autofagia es activada de forma inminente al estrés del RE como un mecanismo defensivo para la supervivencia celular, y que algunos virus estimulan tanto las vías de señalización que incluye la UPR como las relacionadas con el mecanismo autofágico. La conexión de la respuesta autofágica con los mecanismos de muerte celular juega un papel importante en la determinación del destino de las células infectadas; además, datos recientes sugieren la existencia de un posible cruce entre las vías autofágica y apoptótica. Por ejemplo, algunos estudios han demostrado que el proceso de autofagia puede contribuir a la muerte de células infectadas por virus a través de mecanismos apoptóticos. Sin embargo, la modulación de la muerte celular a través de la autofagia es un fenómeno muy complejo, ya que, como indican algunos estudios, la autofagia puede prolongar la supervivencia de las células infectadas por virus contrarrestando la respuesta apoptótica.

La melatonina, principal producto secretor de la glándula pineal, es una molécula producida en muchos tejidos, incluyendo la retina y el tracto gastrointestinal. Juega un papel fundamental en el sistema neuroinmune-endocrino, y además es un potente antioxidante que posee la capacidad de depurar radicales libres con suma eficacia. Diversas estrategias terapéuticas han sido estudiadas con el fin de inhibir la muerte celular en el FHF, pero la mayoría de las dianas descritas ejercen un papel pleiotrópico, pudiendo interferir no sólo en el mecanismo de muerte sino también de supervivencia celular. Se ha demostrado que la administración de melatonina previene el daño inducido mediante diversas sustancias nocivas, como alcohol o Dgalactosamina/lipopolisacárido. Las acciones beneficiosas de la melatonina en el tratamiento de las infecciones víricas, normalmente asociadas al daño inflamatorio y aumentadas en condiciones de estrés oxidativo, están directamente relacionadas con su habilidad para limitar los negativos procesos moleculares que se activan normalmente cuando los virus invaden a las células. Además, es sabido que mediante la infección experimental con el VRHD, un modelo animal de FHF, la melatonina no sólo inhibe la apoptosis de forma dependiente de la dosis, sino que aumenta la regeneración hepática, sugiriendo, por tanto, que el indol podría tener alguna aplicación clínica en el tratamiento de pacientes con este grave síndrome.

Por todo lo anteriormente indicado, y con el fin de esclarecer el mecanismo de interacción del VRHD y su relación con las proteínas autofágicas del hospedador, el principal objetivo de este trabajo ha sido dilucidar los efectos del virus en los mecanismos moleculares que participan en la respuesta autofágica y conocer, además, las conexiones existentes entre estos y las vías de señalización del estrés del RE y de la apoptosis en el contexto de la patogénesis del virus, como modelo animal de FHF humano.

Además, el segundo objetivo del presente estudio ha sido comprobar el posible efecto protector de la administración de melatonina en conejos infectados con el VRHD. Para ello se han estudiado sus efectos sobre la replicación viral y los diversos mecanismos involucrados, así como su relación con el estrés del RE y la apoptosis inducidos por el virus. Por último, se ha pretendido confirmar los efectos de la melatonina profundizando en el estudio de las vías moleculares de la respuesta a estrés del RE y la apoptosis en el modelo animal de FHF de etiología vírica previamente descrito.
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El fallo hepático fulminante

Hace más de 30 años, Trey y Davidson definieron el FHF como un cuadro clínico agudo, de pocas semanas de evolución y sin evidencia de enfermedad hepática preexistente (Trey y Davidson, 1970). Desde entonces se han introducido diversas modificaciones a la misma, aunque hasta el momento no hay una definición universalmente aceptada (Wlodzimirow y cols., 2012).

El FHF es un síndrome clínico muy grave asociado con alta mortalidad (Lee, 1993) a pesar de los grandes avances que se han producido en los campos tanto del manejo de los cuidados intensivos como del trasplante hepático (TH) (Plevris y cols., 1998; Nussler y cols., 2006; Santana-Cabrera y cols., 2006). La mortalidad registrada, antes de que los trasplantes comenzaran a realizarse era extremadamente alta, a menudo superior al 90%. Las causas de muerte incluían fallo multiorgánico, hemorragia, infección y edema cerebral. Afortunadamente, la mortalidad ha disminuido en los últimos 40 años debido a la introducción del TH (Ostapowicz y cols., 2002; Bernal y cols., 2010).

El FHF está caracterizado por un rápido deterioro de la función y una veloz y masiva necrosis hepática, con desarrollo de ictericia, coagulopatía y EH en pacientes sin historia previa de enfermedad hepática o con alteraciones hepáticas crónicas (Detry y cols., 1999; Lee, 2012) que produce un desequilibrio en el que se ven involucradas una gran cantidad de señales de citoquinas y de muerte celular en el contexto del daño hepatocelular (Luedde y cols., 2002). El FHF es un síndrome que se produce como consecuencia del fallo funcional de una gran parte del parénquima hepático (Rosser y Gores, 1995), cuya gravedad es proporcional al grado del daño. El FHF causa profundas alteraciones fisiológicas caracterizadas por encefalopatía, trastornos hemodinámicos y coagulopatía con desarrollo frecuente de edema cerebral y fallo renal (O'Grady, 2005).

Debido a la rápida progresión del FHF, la rápida identificación del síndrome y de su etiología es vital para evitar la muerte del paciente. El fallo orgánico extrahepático debe de estar controlado con avanzados cuidados intensivos. La mejora en el uso del TH ortotrópico es crucial como único tratamiento para salvar a pacientes que no se recuperan de forma espontánea. Como se expondrá a continuación, una mejor comprensión de la fisiopatología del FHF conduciría probablemente a una mejora de las tasas de supervivencia (Wang y cols., 2013a).

2.1.1 Etiología

Las causas que producen el FHF son muy variables; incluyen multitud de tóxicos, virus, problemas metabólicos y vasculares que comprometen al hígado. Las

más frecuentes a nivel mundial son los virus de las hepatitis víricas, particularmente el VHB, pero también el VHA y el de la E (VHE) (Acharya y cols., 2000), sobredosis de drogas y fármacos (especialmente paracetamol), reacciones idiosincrásicas a fármacos, ingestión de toxinas, y desórdenes metabólicos. Otras etiologías son enfermedades hepáticas autoinmunes (Czaja, 2013), isquemia (Henrion, 2012), embarazo (Ichaï y Saliba, 2009), enfermedad de Wilson (Okada y cols., 2010; Sugawara y cols., 2012) e insuficiencia cardíaca congestiva (Saner y cols., 2009). Además, la etiología varía geográficamente y muchas veces es desconocida (O'Grady, 2005). No obstante, en los últimos años, el diagnóstico ha mejorado notablemente, disminuyendo los casos de etiología indeterminada (Germani y cols., 2012).

En países como el Reino Unido y en los EEUU, más del 65% de los casos de FHF son debidos a drogas y fármacos siendo la intoxicación por paracetamol la principal causa (Bernal, 2003; Bernal y cols., 2010). En España el principal responsable es el VHB seguido por los casos en los que la etiología es desconocida, sin embargo, la intoxicación por paracetamol continúa siendo poco común (Fábrega y cols., 2013) (Figura 1).



Figura 1. Etiología del FHF (Ichai y Samuel, 2011).

Establecer la causa del fallo hepático es importante por tres razones principales: iniciar cuanto antes el tratamiento adecuado, eliminar las contraindicaciones del TH y determinar la prognosis. Las causas que originan el FHF se pueden dividir en tres grandes apartados:

- Infecciosas
- Drogas, toxinas y venenos
- No tóxicas ni infecciosas: vasculares, metabólicas, misceláneas o indeterminadas

Las hepatitis víricas agudas constituyen una de las causas más frecuentes de FHF, aunque su prevalencia es variable según la región geográfica: 67% en Francia, 31% en Londres (Bernal y cols., 2009; Ichai y Samuel, 2011), y el 40% en España (Mas y cols., 2010). Los principales virus implicados son los VHA, VHB, VHD y VHE.

La infección por el VHB es la principal causa de FHF a escala mundial, llegando a ser responsable del 70% de los casos de origen vírico (Papaevangelou y cols., 1984). El VHB representó, hasta la década de 1990, alrededor del 50% de casos de fallo hepático agudo. En los últimos 10 años, ha habido en Europa una disminución de fallo hepático producido por el VHB (Ichai y Samuel, 2011). La infección por el VHA es la segunda causa más común de FHF; su prevalencia ha disminuido en niños en ciudades donde se han establecido campañas de vacunación, pero se ha incrementado en los adultos (Wasley y cols., 2008). El VHE se transmite entéricamente y es responsable de las grandes epidemias, transmitidas por el agua, que causan FHF en regiones endémicas desarrolladas (India, América Central, África, Asia) (Balayan, 1997). Se ha observado que las hepatitis producidas por el VHE provocan FHF sobre todo en mujeres en el tercer trimestre de embarazo con gran incidencia en zonas de África y Asia (Ramalingaswami y Purcell, 1998; Jayanthi y Udayakumar, 2008). Tradicionalmente, América del Norte y Europa habían sido consideradas áreas no endémicas, pero ha habido un aumento en la incidencia de hepatitis aguda E en esas zonas industrializadas (Tei y cols., 2003; Dalton y cols., 2007).

Otros virus implicados en casos de FHF son los virus VHS-1 y 2, el virus varicelazóster, citomegalovirus, Epstein-Barr, adenovirus, paramixovirus y de forma asilada se han comunicado casos de hepatitis fulminantes atribuibles a parvovirus B19, coxsackie B y arbovirus, estando condicionada su capacidad de dar lugar a FHF, en gran parte, por coexistir estados de inmunodepresión en los pacientes (Bernuau y cols., 1986; Liang y cols., 1993; Langnas y cols., 1995; Feranchak y cols., 1998).

2.1.2 Clínica

Tanto las manifestaciones clínicas como los análisis de laboratorio son comunes en las diferentes etiologías, salvo peculiaridades específicas. La EH constituye un criterio diagnóstico. Casi siempre, la hiperbilirrubinemia es de tipo conjugado y la ictericia es un signo precoz y rápidamente progresivo (Lee, 1993).

En los estadios tempranos de la insuficiencia hepática y en ausencia de desarrollo de encefalopatía, los pacientes pueden ser controlados mediante cuidados médicos. Sin embargo, en la mayoría de los casos se producen manifestaciones extrahepáticas, incluidas insuficiencia renal y una predisposición a desarrollar infecciones bacterianas y fúngicas (Rolando y cols., 1990, 1996), que no sólo pueden acelerar el desarrollo de encefalopatía, sino también producir un fallo multiorgánico (Bernuau, 2004). Se producen graves trastornos de la coagulación por diferentes mecanismos que favorecen el sangrado en diversas localizaciones, siendo la más frecuente el tracto digestivo superior. La insuficiencia renal aparece en el 30-75% de los casos y se asocia con un peor pronóstico. Es habitual la circulación hiperdinámica, caracterizada por taquicardia, hipotensión, aumento del gasto cardíaco y una disminución de las resistencias periféricas, relacionado todo ello con un desequilibrio entre factores vasodilatadores y factores vasoconstrictores a favor de los primeros. Los pacientes con FHF desarrollan infecciones frecuentes de origen entérico favorecidas por el manejo diagnóstico y terapéutico de estos enfermos. En su patogenia se implican alteraciones funcionales de los neutrófilos, disminución del complemento y, quizás, una deficiencia de la función de las células de Kupffer.

Las manifestaciones sistémicas del fallo hepático pueden variar dependiendo del mecanismo con el que se produce el daño hepático. La ictericia es una característica constante pero extremadamente variable. Las transaminasas séricas, alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransaminasa (AST), aumentan por encima de 30 y 50 veces sus valores normales desencadenando una necrosis masiva en el hígado. La coagulopatía aparece como consecuencia de la pérdida de la capacidad del hígado para producir factores de coagulación. La gluconeogénesis disminuye, como resultado de la pérdida de la función metabólica hepática, lo que origina hipoglicemia (Samson y cols., 1967). El aclaramiento del lactato es también una característica que se desarrolla de forma común a una alteración en la síntesis de urea concurriendo en hiperamonemia.

El pronóstico es importante y han sido desarrollados varios modelos con el fin de identificar aquellos casos que tienen peor pronóstico aun recibiendo asistencia médica. El transcurso y el pronóstico del fallo hepático dependerá de la causa y gravedad del daño hepático, de la capacidad regenerativa del hígado, y del desarrollo de infección (Rolando y cols., 2000).

En los siguientes apartados se analizarán por sistemas las características clínicas y la patogenia en el curso del FHF (Figura 2).



Figura 2. Afectaciones sistémicas del fallo hepático (Shawcross y Wendon, 2012).

Alteraciones del sistema nervioso central

La patogenia de la EH no es completamente conocida; no obstante, los dos factores de mayor importancia han sido el incremento de la concentración de amonio en el sistema nervioso central y el aumento del ácido gamma amino butírico como neurotransmisor inhibidor (Lee, 1993; Mas y Rodés, 1997).

La neurotoxicidad del amonio es bien conocida. Su concentración en la sangre y en el líquido cefalorraquídeo aumenta en el FHF. El amonio inhibe los canales de cloro, lo que contribuye a la depresión del sistema nervioso central, disminuye la neurotransmisión glutamatérgica, causando neurodepresión y, además, altera la barrera hematoencefálica. Sin embargo, no está claro que el amonio sea el único factor en el desarrollo de la encefalopatía. Por ello, se ha propuesto que otras neurotoxinas derivadas del intestino, tales como mercaptanos, fenoles o ácidos grasos de cadena corta, juegan un importante papel.

El estado normal de alerta está determinado por un fino equilibrio entre los neurotransmisores excitadores e inhibidores. Por un lado, el glutamato es el neurotransmisor excitador más importante en el cerebro; en la encefalopatía sus niveles están reducidos, los mecanismos de recaptación están alterados, y los sitios de unión presentan una regulación a la baja. Por otro lado, el ácido gamma amino butírico

es el principal neurotransmisor inhibidor y su tono está aumentado en la EH, lo que se asocia con alteraciones de la función motora y la depresión de conciencia, dos manifestaciones cardinales de la encefalopatía. Se desconoce el mecanismo por el cual dicho tono aumenta (Basile y Jones, 1997).

No sólo la EH, como desorden metabólico, afecta el nivel de consciencia de estos pacientes, también el edema cerebral con aumento concomitante de la presión intracraneal (PIC) altera el estado mental, siendo la causa más frecuente de muerte en los casos de FHF, y la principal diferencia del FHF con la sepsis generalizada (Whitehouse y Wendon, 2013). La clasificación de la EH es esencial para evaluar el pronóstico y asegurar una gestión adecuada de la misma. Generalmente la EH progresa siguiendo cuatro etapas que van desde la confusión, función mental lenta, con alteraciones de la personalidad (grado I), hasta el coma (grado IV), pasando por el comportamiento inadecuado con sopor, letargia, ataxia y asterixis marcada (grado II). El grado III se caracteriza por un estado de estupor, lenguaje inarticulado, somnolencia permanente, respuesta únicamente a órdenes simples, clonus, Babinski y rigidez. El aumento de la PIC es poco frecuente en pacientes con encefalopatía grado I/II; no obstante, en las etapas tempranas ocasionaría un incremento en el nivel de líquido cerebral hasta alcanzar el máximo en las etapas avanzadas. El edema cerebral aparece en un 50 a 85% de los pacientes con FHF y encefalopatía grado III/IV (Lee, 1993; Mas y Rodés, 1997), pudiendo desencadenar una herniación cerebral y muerte (Lee, 2012).

Existen dos teorías para explicar la patogénesis de la EH: la "hipótesis de la glutamina" y la "hipótesis de la hiperemia cerebral". La "hipótesis de la glutamina" se basa en el hecho de que el amonio es destoxificado en el cerebro y convertido en glutamina, cuyos efectos osmóticos en los astrocitos pueden conducir al desarrollo de edema cerebral (Blei, 2008), provocando la hinchazón de los mismos (Norenberg y cols., 2007). Se ha relacionado la concentración de amonio cerebral con la herniación cerebral en pacientes de FHF (Clemmesen y cols., 1999). La "hipótesis de la hiperemia cerebral" propone que el edema se produce como consecuencia de una elevación del flujo sanguíneo cerebral, lo que altera las fuerzas hidrostáticas presentes en los capilares cerebrales. Estudios realizados en pacientes con FHF (Strauss y cols., 1997) y en modelos experimentales (Dempsey y Kindt, 1982) indican que las arteriolas cerebrales se encuentran dilatadas. En pacientes con FHF, la liberación de endotoxinas desde el intestino a la sangre portal puede aumentar la concentración plasmática del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y de algunas interleucinas (IL)-1 β e IL-6 durante la respuesta inflamatoria del hospedador (Wilkinson y cols., 1974; de la Mata y cols., 1990). Otros estudios sugieren que el desarrollo de edema cerebral puede depender tanto de la acumulación de glutamina en los astrocitos, como de los cambios en el flujo sanguíneo cerebral (Córdoba y cols., 1999; Master y cols., 1999).

Según otros autores, el hígado necrótico también podría estar involucrado en la génesis de la hiperemia cerebral, pues la hepatectomía, en pacientes inestables en espera de TH, conduce a una estabilización de los parámetros hemodinámicos sistémicos. Aunque es posible que las citoquinas u otros compuestos liberados por el hígado necrótico puedan contribuir a la vasodilatación cerebral, otras situaciones asociadas con la necrosis masiva del tejido hepático, tales como pancreatitis, no están asociadas con edema cerebral. Asimismo, se ha indicado que en la cirrosis el edema puede aparecer en ausencia de necrosis tisular (Córdoba y cols., 1999).

Si bien es cierto que hasta la fecha hay poca evidencia de la participación directa del estrés oxidativo en pacientes con EH, diversas investigaciones indican que tiene un papel clave en la patogenia de la EH. Aunque se ha demostrado que los factores involucrados en la patogenia de la EH son capaces de generar radicales libres (RL), y disminuir la capacidad antioxidante en el sistema nervioso central, la participación de las especies reactivas del oxígeno generadas por neurotoxinas, como el amonio, no es del todo clara. Se ha comprobado que la infusión de amonio en el cuerpo estriado de ratas da lugar a la producción de radicales hidroxilo (Kosenko y cols., 2003), así como a una disminución significativa en la actividad de enzimas antioxidantes, a un aumento de la peroxidación lipídica, y a una disminución del glutatión (Kosenko y cols., 1997). Se han observado efectos positivos en el tratamiento de EH experimental con distintas sustancias antioxidantes (Song y cols., 2003).

Alteraciones renales y del equilibro ácido-base

Las alteraciones en el equilibrio hidroelectrolítico en el FHF son muy complejas. Entre el 30 y el 75% de los pacientes con FHF desarrolla insuficiencia renal oligúrica, que agrava el pronóstico. La azotemia no es un buen indicador de la función renal debido a la disminución de la síntesis de urea por el hígado, por ello, se prefiere la creatininemia (Ring-Larsen y Palazzo, 1981).

Aunque lo más frecuente es el desarrollo de un fallo renal funcional (aproximadamente en el 50% de los pacientes), los riñones de estos pacientes son histológicamente normales o casi normales con la función tubular renal preservada de manera que el TH o la mejoría del cuadro revierte el fallo renal (Bihari y cols., 1986).

El fallo renal funcional, al igual que en la cirrosis, se relaciona con el desequilibrio entre los factores neurohumorales vasoconstrictores y vasodilatadores renales. De manera que, al igual que en los pacientes cirróticos con síndrome hepatorrenal, los pacientes con FHF e insuficiencia renal exhiben una grave vasoconstricción renal con disminución de la perfusión renal y del filtrado glomerular, con una función tubular conservada en el contexto de una marcada vasodilatación

sistémica (Lee, 1996). El pronóstico del síndrome hepatorrenal es desfavorable con una mortalidad del 90%.

Aproximadamente un 50% de los pacientes con FHF exhiben signos clínicos asociados con hipertensión portal como son la ascitis y el síndrome hepatorrenal. Se ha sugerido que la hipertensión portal podría estar causada por un aumento de la resistencia hepática al flujo sanguíneo portal como consecuencia del colapso sinusoidal y la distorsión de la arquitectura hepática después de producirse la necrosis hepatocelular extensa (Navasa y cols., 1992).

La hipopotasemia se produce frecuentemente en las primeras fases y puede desencadenar arritmias letales. La hiponatremia, que sugiere retención acuosa y disminución de depuración del agua libre, se debe a una disminución del filtrado glomerular que determina una menor llegada de orina primaria a los segmentos distales de la nefrona, junto con el aumento de la hormona antidiurética. La hipofosfatemia es particularmente común en casos de sobredosis por paracetamol (Valla y cols., 1989).

La alcalosis respiratoria es el trastorno acidobásico más frecuente. En etapas tempranas de la EH se observa frecuentemente una alcalosis respiratoria de origen central, secundaria a algún mediador tóxico. Se asocia con una disminución de la disociación de la oxihemoglobina y una disminución de la perfusión cerebral y del consumo de O₂ cerebral (Bihari y cols., 1986). También es precoz una alcalosis metabólica que puede deberse a la hipopotasemia, o ser secundaria al fallo en la alcalinización de la orina.

En la evolución del FHF se desarrolla una acidosis metabólica láctica, particularmente asociada con la hipoglucemia y el fallo de la circulación periférica. Se ha sugerido que la acidosis láctica puede deberse tanto al fallo de la gluconeogénesis como a un aumento del metabolismo aeróbico. Por último, puede existir también una acidosis respiratoria por depresión del centro respiratorio, secundario al edema cerebral.

Alteraciones respiratorias

En relación al centro respiratorio, en las fases iniciales del FHF se produce una hiperestimulación que lleva a una alcalosis respiratoria, pero en la evolución, y de forma secundaria al aumento de la PIC, puede desarrollarse una acidosis metabólica por depresión del centro respiratorio que conduce al paro respiratorio.

A nivel macrocirculatorio, el patrón típico del FHF es muy similar al de la sepsis, con aumento del gasto cardíaco y disminución de la resistencia vascular periférica, que en la evolución puede llegar a la hipotensión y "shock". A veces el "shock" puede ser de causa central por depresión del centro vasomotor, siendo de muy difícil tratamiento (Harrison y cols., 1991).

Alteraciones de la coagulación

Las alteraciones en el mecanismo de la coagulación son un hallazgo prácticamente constante en el FHF, debido al papel del hígado en la síntesis de los factores de la coagulación, con excepción del factor VIII, que es sintetizado por el endotelio. El tiempo de protrombina (TP) se prolonga, en general por encima del 50%, siendo éste un elemento pronóstico. El factor VII es el primero en disminuir por su vida media corta y el aumento del catabolismo le afecta poco. El descenso de este factor indica que el daño hepático ha ocurrido independientemente de los factores dependientes de vitamina K y es un factor pronóstico y de seguimiento evolutivo. La concentración de fibrinógeno es la última en disminuir, ya que el hígado preserva la capacidad de sintetizarlo hasta las etapas finales del FHF.

Si bien puede ocurrir una fibrinolisis y una coagulación intravascular diseminada (CID) de bajo grado, estos síndromes son difíciles de distinguir de los cambios debidos a fallos de la síntesis hepática. No obstante, la CID puede acentuarse por complicaciones hemorrágicas, reposición de factores, infección o endotoxemia. Se altera la función y el número de plaquetas, situándose por debajo de 100.000/µl (Lee, 1993).

Alteraciones metabólicas

Alteraciones metabólicas como la enfermedad de Wilson, el síndrome HELLP (hemólisis, enzimas hepáticas elevadas, y niveles bajos de plaquetas), la galactosemia, el síndrome de Reye, la intolerancia hereditaria a la fructosa, la hemocromatosis, la deficiencia en α 1-antitripsina y la tirosemia pueden provocar FHF (Wang y cols., 2013a).

La enfermedad de Wilson es un trastorno genético que provoca alteraciones en la excreción del cobre hepático, ya que se produce una acumulación en varios órganos vitales como hígado, cerebro y riñones. En el hígado, si el paciente no responde a los posibles tratamientos, la enfermedad progresa hasta ocasionar un fallo hepático agudo; por tanto, llegados a este punto, el TH junto con una inmunosupresión de por vida son las únicas soluciones. El trasplante de hepatocitos humanos está siendo utilizado como tratamiento para enfermedades hepáticas consistentes en defectos metabólicos (Filippi y Dhawan, 2014). El daño hepático producido por el síndrome HELLP es el resultado de alteraciones en la placentación, lo que conduce a una circulación de factores antiangiogénicos, a una disfunción endotelial, o a una producción de citoquinas responsables de hemorragia periportal y depósito de fibrina (Sánchez-Bueno y cols., 2012).

Una situación frecuente, ya que se produce en más del 40% de los casos de FHF, es la hipoglucemia, secundaria a la alteración de la gluconeogénesis y a los bajos niveles de glucógeno hepático (Lee, 1996). Por otra parte, los niveles de insulina están elevados por una disminución de su metabolismo, lo que aumenta su vida media; este aspecto, junto con la hiponatremia, puede explicar parte de las manifestaciones encefálicas. La presencia de hipoglucemia constituye otro elemento pronóstico. No es raro que estos pacientes presenten una pancreatitis asociada; además, el colesterol suele presentar niveles bajos y los ácidos grasos libres están aumentados en plasma.

2.1.3 Anatomía patológica

En el FHF, de acuerdo con el patrón enzimático, se pueden considerar dos tipos anatomopatológicos de lesión hepática. En el tipo I aparecen áreas confluentes de necrosis hepatocitaria, y cursa con una elevación muy marcada de las transaminasas séricas y de la bilirrubinemia. Sus causas pueden ser virus hepatotropos, tóxicos como el paracetamol, halotano o isoniazida, intoxicación por *Amanita phalloides* o isquemia hepática. El tipo II se caracteriza por un acúmulo microvesicular de grasa en el citoplasma hepatocitario, sin desplazamiento de los núcleos. Aunque también aumenta la transaminasemia, lo hace en menor grado. Algunos ejemplos de este tipo de FHF son la degeneración aguda grasa del embarazo, el síndrome de Reye, la toxicidad por tetraciclinas o ácido valproico y la hepatitis aguda alcohólica (Lee, 1993; 1996).

Macroscópicamente el hígado manifiesta tumefacción e hiperemia. Las características histológicas de la hepatitis aguda son las siguientes:

 Lesiones predominantemente centrolobulillares: cuerpos acidófilos (necrosis celular aislada de coagulación), balonización (degeneración vesicular hidrópica), necrosis lítica (necrólisis precoz); la trama reticular del hígado está conservada. Los mecanismos por los que se produce la lesión de los hepatocitos son controvertidos, probablemente sean de tipo inmunológico. Varios estudios han implicado a las propias células residentes del hígado, especialmente las células de Kupffer y las células endoteliales, en combinación con elementos del sistema inmune como participantes en el proceso destructivo que lleva al fallo hepático, bien sea por necrosis o por apoptosis (Pessayre y cols., 1999).

- 2. Infiltrado inflamatorio: hay infiltración linfo-histiocitaria en todos los espacios porta, e infiltración en los lobulillos, que puede ser difusa o focal.
- 3. Aparecen signos regenerativos como mitosis, y aumento del número de hepatocitos binucleados.

En el caso de las hepatitis agudas virales la necrosis se manifiesta de las siguientes formas: I. Necrosis masiva, cuando compromete más del 85%, la evolución es la de una hepatitis fulminante, con una grave insuficiencia hepática. El aspecto del hígado varía según el tiempo que sobreviva el paciente: si son pocos días, el hígado está disminuido de tamaño y consistencia, es friable; al corte domina una coloración amarillenta anaranjada; el parénquima aparece turbio. Si son algunas pocas semanas, el hígado, empequeñecido, es flácido; al corte domina un color rojizo en zonas esplenizadas: homogéneas, brillantes, con pérdida de la estructura lobulillar. Microscópicamente corresponden a zonas de colapso de la trama fibrilar, con gran ingurgitación sanguínea de los sinusoides, entre los cuales se encuentran detritus celulares (Figura 3). Si son algunos meses, el hígado, pequeño, muestra extensas cicatrices que alternan con nódulos regenerativos. Estos tres cuadros morfológicos se denominan en la patología clásica: atrofia amarilla aguda, atrofia roja subaguda e hiperplasia nodular múltiple (de Marchand). II. Necrosis en puente, necrosis de hepatocitos en áreas que unen espacios porta entre sí (porto-portal) o espacios porta con venas centrolobulillares (porto-central). Generalmente se observa como un área de desaparición de células hepáticas, acompañada de un colapso del retículo: no se aprecia la etapa de necrofanerosis. III. Necrosis en sacabocado o necrosis erosiva, destrucción de hepatocitos aislados de la placa limitante periportal, con interrupción de ésta. En lugar de los hepatocitos hay infiltración linfocitaria, que tiende a rodear a los hepatocitos, generalmente balonizados en vías de desaparición. Tampoco se aprecia la etapa de necrofanerosis en este caso. La presencia de necrosis en sacabocado puede significar el paso a la llamada hepatitis crónica activa.



Figura 3. Necrosis masiva del hígado, con ingurgitación sanguínea de sinusoides y proliferación de conductillos.

2.1.4 Diagnóstico

El diagnóstico de FHF debe ser considerado en cualquier persona que presente una reciente enfermedad hepática en la que el TP se haya prolongado. Las alteraciones mentales, sutiles en muchos casos, son parte de prácticamente todas las definiciones, incluyendo, en un principio, agitación y confusión, hasta grados de coma más profundos (Ostapowicz y cols., 2002; Lee y cols., 2008; Bernal y cols., 2010). Cualquier alteración mental junto con un prolongado TP define el diagnóstico de FHF, siempre que se haya desarrollado una enfermedad de corta duración y no exista cirrosis. La combinación de coagulopatía y encefalopatía es única y sólo ha sido observada en estos casos. La presencia de cualquier grado de encefalopatía indica una severa y potencialmente condición mortal que requiere hospitalización inmediata. Son obligatorias una rápida evaluación para el traslado a un centro de trasplante y la consideración para el TH una vez que se ha producido cualquier grado de alteración mental, ya que la progresión de la enfermedad es muy rápida una vez que la cognición ha sido alterada (Lee, 2012).

Además del aumento del TP y la encefalopatía el diagnóstico de FHF se basa en otros aspectos clínicos, como la aparición de ictericia junto con la alteración de algunos datos bioquímicos: aumento de la bilirrubina total a expensas de la directa, y disminución del nivel plasmático del factor V. En general, la prolongación del TP por encima del 50% precede en horas o semanas a la aparición de encefalopatía clínicamente evidente (Caraceni y VanThiel, 1995; Mas y Rodés, 1997).

En muchos casos este síndrome clínico se asocia con edema cerebral, alteración de la función renal y disfunción orgánica múltiple. Se pueden distinguir diferentes patrones de presentación vinculados a la etiología del FHF; por ejemplo, el FHF por sobredosis de paracetamol se presenta generalmente con encefalopatía y coagulopatía graves que puede progresar rápidamente al edema cerebral con escasa ictericia; en cambio, en los pacientes con FHF por hepatitis vírica, a menudo se presenta con intensa ictericia pero con menos probabilidad de desarrollar edema cerebral (Lee, 1993; McPhail y cols., 2010).

2.1.5 Clasificación

Desde que en 1970 Trey y Davidson propusieran una definición para el FHF, algunos autores han aportado distintas clasificaciones con el objetivo de establecer un pronóstico y una acción terapéutica en cada caso basándose fundamentalmente en la duración del periodo de tiempo transcurrido entre el inicio de los síntomas clínicos o la aparición de ictericia y el desarrollo de encefalopatía. Así en el King's College Hospital de Londres, O'Grady y Williams propusieron tres categorías (O'Grady y Williams, 1993; McPhail y cols., 2010; Lee, 2012; Rumack y Bateman, 2012):

- 1. Fallo hepático hiperagudo: cuando la encefalopatía se produce dentro de los primeros 7 días desde la aparición de la ictericia.
- 2. Fallo hepático agudo: cuando el intervalo entre la ictericia y la encefalopatía se encuentra entre los 8 y los 28 días.
- Fallo hepático subagudo: cuando la encefalopatía se produce entre las 4 y las 26 semanas de la aparición de la ictericia.

Si bien el primer y segundo grupo tienen alta incidencia de edema cerebral (69 y 56%, respectivamente), el segundo grupo tiene un desfavorable pronóstico sin TH (7% de supervivencia) a diferencia del primer grupo (36% de supervivencia), en el que el tratamiento médico adquiere mayor importancia. El fallo hepático hiperagudo es causado principalmente por hepatotoxicidad y se caracteriza por altos niveles de transaminasas y bajos niveles de bilirrubina. En esta categoría, la EH se desarrolla tan rápidamente que a veces precede a la ictericia. El tercer grupo tiene baja incidencia de edema cerebral (14%), aunque el pronóstico con tratamiento médico es también desfavorable (14% de supervivencia).

Por otra parte, en el Hospital Beaujou de París, Bernuau y Durand clasificaron el FHF en dos grupos (Bernuau y Durand, 1997):

- 1. Fallo hepático fulminante: cuando la encefalopatía se desarrolla dentro de las dos semanas de iniciada la ictericia.
- 2. Fallo hepático subfulminante: cuando el intervalo entre la ictericia y la encefalopatía se sitúa entre las 2 y 12 semanas.

Las manifestaciones de hipertensión portal, incluyendo ascitis y hemorragia digestiva por várices esofágicas, son más comunes en el síndrome de fallo hepático subfulminante. El espectro de las alteraciones neurológicas también difiere: en el fallo hepático subfulminante la encefalopatía puede no producirse hasta muy avanzada la enfermedad, en cambio, en el FHF el grado de EH y su duración son importantes predictores pronósticos. Aunque el edema cerebral y la herniación cerebral es la mayor causa de muerte en el FHF, con una incidencia superior al 50%, es infrecuente en los fallos hepáticos subfulminantes y las hepatopatías crónicas, en las que se vale de mecanismos compensadores que previenen el desarrollo de herniación cerebral mediante la inhibición de los factores que inician el edema vasogénico y citotóxico (Williams, 1996).

2.1.6 Tratamiento

El manejo de los pacientes con FHF debe comenzar tan pronto como sea posible, siendo fundamental la remisión del paciente a las unidades especializadas (Bernuau, 2004). El tratamiento curativo de los pacientes con FHF depende del tratamiento médico y del TH. Son fundamentales tres aspectos: a) en algunos pacientes es posible la recuperación espontánea sin secuelas, b) la terapéutica inapropiada, en especial con fármacos, puede agravar inesperadamente el estado del enfermo y c) el TH es un tratamiento eficaz (Bernuau y cols., 1986).

El ingreso de los pacientes en unidades de cuidados intensivos especializadas en el manejo de los mismos, permite el control de muchas de las complicaciones que presentan y aumenta las posibilidades de que el paciente permanezca vivo en espera de la recuperación espontánea de la función hepática o de la llegada de un órgano (Lee, 2012). A la hora de considerar el tratamiento médico se deben tener en cuenta tres máximas fundamentales: a) la regeneración hepática es el objetivo fundamental y debe intentarse por todos los medios, b) hay que seguir exhaustivamente el curso de la enfermedad y repetir periódicamente valoraciones pronósticas y c) el metabolismo de los fármacos está profundamente alterado, por lo que se deben extremar los cuidados a la hora de prescribirlos (Tygstrup y Ranek, 1981).

La encefalopatía y el edema cerebral son la causa más frecuente de muerte en estos pacientes debido al enclavamiento cerebral producido por el aumento de la PIC. Como se ha indicado anteriormente, se han correlacionado altos niveles de amonio arterial con el desarrollo de edema cerebral, lo que ha reforzado "la hipótesis de la glutamina" (Clemmesen y cols., 1999; Jalan, 2005; Blei, 2008). En este sentido, los trastornos metabólicos que son potencialmente perjudiciales para la función cerebral, como hipoxemia, hipoglucemia, hiponatremia, hipofosfatemia y acidosis metabólica, deben prevenirse y corregirse (Jalan, 2005). La PIC debe monitorizarse fundamentalmente en los casos de EH avanzada (a partir del grado III). Esta técnica lleva consigo complicaciones de riesgo; sin embargo, la colocación de sensores de presión intracraneales, situados preferentemente en posición epidural, disminuye el riesgo de complicaciones, por lo que se ha considerado a esta técnica bastante eficaz para la prevención de la herniación cerebral secundaria al edema, así como para la selección de posibles candidatos para el TH (Córdoba, 2002).

El manejo de los trastornos metabólicos obliga a administrar bolos adicionales de dextrosa y a monitorizar cuidadosamente las cifras de glucemia para detectar y corregir las hipoglucemias, que son asintomáticas la mayoría de las veces. Los pacientes son propensos a desarrollar hipoglicemia ya que la necrosis de los hepatocitos causa agotamiento de glucógeno y una glucogenolisis y gluconeogénesis defectivas. El rápido desarrollo de la hipoglucemia puede confundir el diagnóstico de la EH, por lo que debe ser tratada con una infusión continua de glucosa intravenosa (Tam y cols., 2012). También hay que corregir la hipofosfatemia. Sin embargo, la alcalosis no debe tratarse. Si existe acidosis metabólica hay que diagnosticar y tratar los factores desencadenantes y perfundir bicarbonato sódico, o recurrir incluso a la hemodiálisis (Lee, 1996). Un estudio ha sugerido que el tratamiento con soluciones salinas hipertónicas podría retrasar el inicio de la PIC, por lo que sería recomendable en pacientes con elevado riesgo de desarrollar edema cerebral, ya que podría mejorar el éxito a la hora de realizar un TH de emergencia (Murphy y cols., 2004).

En lo que al tono cardiovascular se refiere, la mayoría de los pacientes muestran una marcada vasodilatación y presiones arteriales medias disminuidas. Además, debido a la escasa ingesta y a la encefalopatía, muchos presentan niveles bajos en la volemia por lo que requieren fluido inicial de reanimación y determinación de la presión venosa central. El uso de vasopresina y de su análogo terlipresina es controvertido: por un lado, se trata de potentes vasoconstrictores que permiten que aumente la presión sanguínea; sin embargo, esto debe equilibrarse con un aumento del volumen sanguíneo cerebral y con un aumento transitorio de la PIC (Shawcross y cols., 2004). La vasopresina es particularmente un potente constrictor de la vasculatura mesentérica y no es recomendado en pacientes con hepatitis isquémica. Además, hay que considerar que los vasopresores no deberían ser usados sin optimización del volumen circulante, y que la monitorización del gasto cardiaco puede ser útil para evaluar la necesidad de seguir la reanimación con fluidos (Whitehouse y Wendon, 2013).

La hemodinamia renal es similar a la de pacientes con síndrome hepatorrenal con cirrosis: la resistencia vascular sistémica baja y la vasoconstricción de la arteria renal es potencialmente reversible con mejora de la función hepática. Los pacientes con intoxicación por paracetamol pueden desarrollar fallo renal agudo, debido al efecto tóxico directo del fármaco, con oliguria y requieren hemodiálisis venovenosa continua (Stravitz y Kramer, 2009); sin embargo, los pacientes con FHF toleran con problemas la hemodiálisis debido a su inestabilidad circulatoria y a su elevada PIC (Devauchelle y cols., 2012). La nefrotoxicidad directa por drogas y la necrosis tubular aguda debida a isquemia como resultado de la hipotensión son las entidades más importantes asociadas a la enfermedad. El cuidado médico consiste en evitar agentes nefrotóxicos, el tratamiento de la infección, el mantenimiento de una perfusión renal adecuada y terapia de reemplazo renal.

Las alteraciones graves de la coagulación son debidas en parte a un fallo en la síntesis y en el consumo continuo de plaquetas y factores de la coagulación. El recuento plaquetario disminuye por debajo de los niveles normales (Schiødt y cols., 2003); sin embargo, la tromboelastografía es con frecuencia normal. En general, hay anormalidades tanto en la vía de la coagulación como en la fibrinolítica; datos recientes sugieren que los defectos están equilibrados, es decir, hay una preservación

relativa de la hemostasia a menos que el recuento de plaquetas sea muy bajo (Stravitz y cols., 2012). Debido a que los trastornos de la coagulación constituyen el elemento pronóstico más valioso en la insuficiencia hepática, no debe intentarse corregirlos si no hay hemorragias. La administración de plasma fresco congelado no mejora la supervivencia, sino que modifica el estado de la coagulación que, al ser el pronóstico más fiel, expone al paciente a la indicación inadecuada del TH. La trombopenia obliga algunas veces a transfundir plaquetas junto con pequeñas cantidades de heparina para impedir que aumente la CID (Lee, 1996). La deficiencia en vitamina K ha sido descrita en la fisiología del FHF, por lo que su administración es altamente recomendada (Pereira y cols., 2005). Se desconocen las causas, pero el sangrado espontáneo en el FHF es infrecuente; es raro que se desarrollen hemorragias clínicamente significativas que requieran transfusión de sangre (Boks, y cols., 1986). Además, existe un aumento en la presión venosa portal debido a los cambios arquitectónicos en la estructura del hígado (Valla y cols., 1989), no obstante, el sangrado de las várices esofágicas casi nunca se produce y sigue siendo uno de los criterios empleados en la distinción entre fallo hepático agudo y crónico.

La regeneración hepática es una respuesta fundamental del hígado ante el daño tisular. Se considera que el índice de regeneración hepática puede ser fundamental en el pronóstico de estos pacientes (Doria y cols., 2007). Se ha observado que, tras el tratamiento con el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β) en un modelo de FHF en ratas provocado por tetracloruro de carbono, se observó aumentada de forma clara la regeneración hepática (Armendariz-Borunda y cols., 1993). El agente antimicrobiano ciprofloxacino también aumenta significativamente la actividad de regeneración hepática en un modelo de FHF en rata, muy probablemente por bloquear los receptores de la membrana hepatocitaria para el ácido yaminobutírico, un inhibidor de la regeneración hepática, cuyos niveles están muy elevados en el FHF (Kaita y cols., 1998). El papel de las células progenitoras del hígado o células madre residentes del hígado es controvertido (Theise y cols., 2013). No obstante, se ha comprobado recientemente que durante un daño agudo o fallo hepático se produce un aumento de células progenitoras del hígado en ratones y humanos, sugiriendo que contribuye de forma importante a la restauración del parénquima y función hepática (Ochoa y cols., 2010; Khuu y cols., 2013). Algunos de los factores que promueven el aumento de las células progenitoras del hígado incluyen las citoquinas IL-6, TNF- α , TGF- β , así como al factor de transcripción nuclear kappaB $(NF-\kappa B)$, y factores de crecimiento como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Campbell y cols., 2001). Hormonas como la insulina y somatostatina (Jung y cols., 2012), adipoquinas como la leptina (Nobili y cols., 2012) y neurotransmisores como serotonina, epinefrina, o norepinefrina participan también en la regulación de la respuesta de las células progenitoras del hígado y en su crecimiento. Se ha observado que la anfirregulina, un factor de crecimiento, contribuye a la regeneración hepática en sus fases más tempranas, tanto en cultivos celulares como en estudios *in vivo*, pudiendo tener aplicaciones terapéuticas en la fabricación de medicamentos para el daño hepático agudo (Berasain y cols., 2005). Del mismo modo, se ha descrito el papel de la cardiotrofina-1, una citoquina perteneciente a la familia de la IL-6, como un factor de supervivencia de hepatocitos, que reduce de forma eficiente el daño hepatocelular en modelos animales de FHF (Bustos y cols., 2003; Marquès y cols., 2007; Tuñón y cols., 2011b).

El TH ortotrópico continúa siendo el tratamiento definitivo para pacientes con FHF en los que el daño hepático es irreversible (Wang y cols., 2013a). Más del 12% de los trasplantes que se realizan son debidos a un FHF; los rangos de supervivencia de estos pacientes son de un 70-95% (O'Grady, 2005). El principal requisito previo para el TH en los pacientes afectados de FHF es llegar a un pronóstico individual exacto, ya que esta decisión debe contemplar la posibilidad de trasplantar a un paciente que no lo requiera porque podría tener una recuperación espontánea y, consecuentemente, sería sometido a un riesgo quirúrgico y por inmunosupresión innecesario, o, por el contrario, no dar la oportunidad de trasplante a alguien que no sobreviviría sin él. En general, los factores clave implicados en el pronóstico, y por tanto, gravedad, del FHF son la etiología, el grado de encefalopatía y de daño hepático, y el riesgo de complicaciones extrahepáticas (Wang y cols., 2013a). Esta decisión tienen que tomarla hepatólogos con experiencia en pacientes afectos de FHF. Por ello han sido ideados varios sistemas de puntuación entre los que destacan los del King's Collage Hospital, cuyos criterios son ampliamente utilizados para evaluar la gravedad de cada caso (O'Grady y cols., 1989).

Debido a la cada vez mayor demanda de órganos para el trasplante y la escasez de estos, en los últimos años se han desarrollado una serie de técnicas y tratamientos tales como los sistemas de soporte hepático extracorpóreo, biológicos, bioartificiales y artificiales, así como el trasplante de hepatocitos, que es un método menos invasivo y puede efectuarse repetidas veces, siendo una alternativa al trasplante total del órgano (Bilir y cols., 2000; Strom y Fisher, 2003; Nussler y cols., 2006).

Los dispositivos de soporte hepático extracorpóreos han sido recomendados para reemplazar la función hepática en pacientes con FHF; sin embargo, la complejidad de las funciones hepáticas metabólicas de síntesis, destoxificación y excreción dificulta el manejo (Wang y cols., 2013a).

Los dispositivos biológicos consisten en plasmaféresis de alto volumen, o dispositivos con hepatocitos aislados, o componentes hepáticos. Los sistemas bioartificiales, formados por tejido biológico combinado con materiales no biológicos, están desarrollados a partir de biorreactores que contienen hepatocitos vivos y funcionalmente activos de origen humano o porcino (Ellis y Wendon, 1996). Existen dos sistemas de soporte hepático extracorpóreo mixto: el "HepatAssist TM 2000" y el

"Extrahepatic Liver-Assist Device". El primero utiliza hepatocitos de porcino y el segundo una línea celular derivada de hepatoblastoma humano. Ambos sistemas han demostrado mejorar los parámetros clínicos y podrían ser utilizados como puente para el trasplante, pero aún son necesarios más estudios (Stadlbauer y cols., 2008).

Los dos sistemas de soporte extrahepático que ofrecen en la actualidad los mejores resultados son el MARS (sistema de recirculación con adsorbentes moleculares, del inglés, *Molecular Adsorbent Recirculating System*) (Stange y cols., 1999; Arroyo y cols., 2008) y la terapia "Prometheus" (separación de plasma fraccionado, adsorción y diálisis) (Rifai y cols., 2003). MARS destoxifica a través de una membrana con albúmina humana exógena y "Prometheus" hace pasar el plasma por dos columnas con un circuito de diálisis convencional (Hessel y cols., 2006; Rikker, 2009). MARS permite la eliminación de proteínas de unión y de toxinas solubles en agua. La diálisis de albúmina permite que se regenere selectivamente la albúmina del paciente, por lo que aumenta la capacidad de unión de las proteínas a la albúmina (Figura 4). El tratamiento, por tanto, puede contribuir a la regeneración del hígado y a la estabilización de las funciones de órganos vitales en pacientes con TH (Mitzner, 2011). Se ha observado también que el tratamiento con MARS disminuye el riesgo de complicaciones cerebrales e incluso podría aliviar la EH en pacientes con un hígado completamente necrótico (Kantola y cols., 2011).



Figura 4. Apariencia real y esquema del funcionamiento del sistema de recirculación con adsorbentes moleculares, MARS (Arroyo y cols., 2008).

De todos modos, estas técnicas aún requieren demostrar de forma fehaciente su eficacia y viabilidad y son necesarios más datos clínicos que puedan avalar su eficacia en pacientes con FHF (Rademacher y cols., 2011). Además, en términos de aplicación clínica, son absolutamente necesarios estudios funcionales en modelos animales (Nussler y cols., 2006).

2.2 Modelos animales de fallo hepático fulminante

Como se ha expuesto anteriormente, el TH ortotrópico es el medio más eficaz para mejorar la tasa de supervivencia en el FHF; sin embargo, no siempre es posible realizar el procedimiento en el momento oportuno, y, debido a que es necesaria la inmunosupresión, a que la incidencia de enfermedad hepática es cada vez mayor, y a que el número de donantes de órganos es escaso, el apoyo hepático es indicado temporalmente mientras los pacientes esperan por un TH. Han sido muchos los intentos de desarrollar un modelo adecuado utilizando una gran variedad de especies y de modalidades, desde los modelos inducidos por manipulación quirúrgica, entre los que se incluyen la isquemia hepática, la hepatectomia completa, hasta la utilización de sustancias hepatotóxicas como el acetaminofeno, azoximetano, concanavalina A, sulfoximina butionina, galactosamina y anatoxina-endotoxina, entre otras. Además, aunque se han llevado a cabo varios ensayos clínicos donde se han desarrollado y probado nuevos dispositivos de soporte hepático, aún son necesarios los modelos animales experimentales reproducibles de FHF que cumplan satisfactoriamente las condiciones clínicas del FHF humano, con el fin de aumentar el conocimiento de las alteraciones metabólicas y fisiopatológicas del síndrome, y de desarrollar nuevas modalidades terapéuticas (Tuñón y cols., 2007).

El modelo ideal debería presentar criterios clínicos y bioquímicos bien definidos que, como los criterios pronósticos del King College para el FHF (O'Grady y cols., 1989), sean capaces de lograr una estimación acertada de prognosis. Sin embargo, hasta la fecha, ninguno de los modelos desarrollados cumple estas premisas. Además, los criterios clínicos y bioquímicos utilizados para indicar la existencia de FHF, y las dificultades que supone la investigación en pacientes, hacen que los modelos animales tengan un papel fundamental en los estudios futuros.

Según criterios ampliamente reconocidos por la comunidad científica, un modelo ideal de FHF debería cumplir una serie de requerimientos entre los que se incluyen: que el modelo pueda ser reversible, en el sentido de que algunos animales puedan sobrevivir al proceso si se utiliza un tratamiento adecuado; los resultados obtenidos deben ser reproducibles, es decir, conducir a la muerte en un periodo de tiempo determinado y que la extensión del daño hepático pueda ser medible y estadarizable. Además, la muerte debe producirse por fallo hepático en un periodo de tiempo conocido, es decir, los acontecimientos producidos tras el daño tienen que reflejar el patrón clínico típico del hombre y la muerte debe ser el resultado directo del daño producido al hígado. Asimismo, el animal debe tener un tamaño suficiente como para permitir una adecuada toma seriada de muestras sanguíneas y de diversos tejidos mientras se llevan a cabo los tratamientos adecuados. Finalmente, todos los métodos utilizados deben presentar el menor riesgo para las personas involucradas en los estudios (Terblanche y Hickman, 1991).

2.2.1 Modelos quirúrgicos

Los modelos quirúrgicos de FHF pueden ser clasificados en tres categorías: la hepatectomía (total o parcial), la desvascularización (total o parcial), y aquellos que resultan de la combinación de los dos anteriores.

2.2.1.1 Hepatectomía total y parcial

Los modelos quirúrgicos de eliminación total y/o parcial del hígado se han desarrollado con éxito en diversas especies animales después del primer intento realizado en perros (Mann, 1921). En cerdos se describió un modelo potencialmente reversible, que combina la hepatectomia parcial (70%) con la derivación portocava y que produce la muerte por FHF después de un periodo de tiempo suficientemente largo como para permitir estudios sobre soportes hepáticos; el animal es de tamaño adecuado y la técnica no presenta peligro (Filipponi y cols., 1991; Fukueda y cols., 2006).

Se ha podido establecer en ratas que una resección del 95% del hígado es un buen modelo de FHF (He y cols., 2003) mientras que en ratones una hepatectomía de menos del 90% es el límite de seguridad como modelo de estudio de regeneración hepática, ya que por encima de dicho valor se encuentra en un nivel de fallo hepático mortal (Makino y cols., 2005). No obstante, se ha desarrollado un nuevo modelo de FHF en rata consistente en un 68% de hepatectomía parcial, isquemia del 24% de la masa hepática y un 8% de hígado remanente intacto, en el que la administración subcutánea de glucosa en condiciones normotérmicas permite una mayor supervivencia y el desarrollo de todas las características clínicas del FHF (Detry y cols., 2013).

La hepatectomía total del hígado presenta los inconvenientes de la ausencia de productos derivados de la necrosis hepática y transmisores de señales fundamentales en el mecanismo patogénico del fallo hepático. Por otro lado, sus ventajas se limitan a la reproductibilidad y a su utilidad para el estudio de diversos soportes artificiales *in vivo* en ausencia de los productos tóxicos eliminados o producidos por el hígado dañado. A pesar de los inconvenientes reseñados, la hepatectomía se ha utilizado en ratas para estudios de regeneración hepática (Eguchi y cols., 1997) y en cerdos como modelo reproducible para comprobar la eficacia y función de diversos sistemas temporales de soporte hepático (Filipponi y cols., 1999).

Se ha podido demostrar en ratas sometidas a diversos grados de hepatectomía parcial, mediante el análisis de ADN, que el FHF inducido es consecuencia tanto del

incremento de la apoptosis como de la disminución de la regeneración hepática (Morita y cols., 2002).

2.2.1.2 Desvascularización

La desvascularización completa del hígado se ha utilizado con éxito para inducir un fallo hepático reproducible en cerdos que pueda ser utilizable para el estudio de diversos sistemas de soportes hepáticos artificiales y/o bioartificiales (Sen y cols., 2006), o para la constatación del efecto de sustancias antioxidantes tales como la Nacetilcisteína (Ytrebø y cols., 2001). Así, se desarrolló un modelo reproducible en minicerdos por la desvascularización reversible mediante ligadura de la arteria hepática y anastomosis portocava en el que se monitorizó la PIC además de otros parámetros característicos del FHF. Este modelo presenta una ventana terapéutica de unas 8 horas, lo que podría permitir la realización de pruebas con diversos soportes de hígado bioartificiales (Ryska y cols., 2004).

Para comprobar la eficacia de diversos sistemas de soporte tanto bioartificiales como artificiales se utilizan con frecuencia modelos animales de mayor tamaño, como el cerdo, al que se le induce un fallo hepático mediante la isquemia del órgano por derivación portocava y ligadura de la arteria hepática (Nakazawa y cols., 2002), o mediante desvascularización total (Ytrebø y cols., 2002).

También se ha utilizado un modelo de FHF en perros mediante una derivación portocava combinada con la ligadura del conducto biliar para comprobar un nuevo sistema de hígado bioartificial mediante la inoculación de hepatocitos porcinos en biorreactores (Chen y Ding, 2006), así como un modelo porcino en el que se combina una resección del 75-80% del hígado después de un periodo de isquemia (Ladurner y cols., 2005).

En estudios realizados sobre el tiempo de supervivencia, la facilidad técnica, seguridad y reproductibilidad de los dos tipos de modelos quirúrgicos de FHF, se puso de manifiesto que la desvascularización parece más útil para estudiar el desarrollo y tratamiento del FHF causado por la isquemia y sus efectos secundarios, mientras que la hepatectomía parcial parece superior en la investigación del estatus de la falta del hígado y el tratamiento del FHF mediante sistemas de soportes hepáticos bioartificiales (Frühauf y cols., 2004).

2.2.2 Modelos inducidos por sustancias químicas

El uso de agentes químicos tales como el acetaminofeno, sulfoxinina butionina o galactosamina, aunque en algunos casos pueden reproducir un número de

importantes características clínicas tales como la hipoglucemia, encefalopatía y aumento de enzimas hepáticas, requieren la administración repetida, una monitorización estrecha de sus concentraciones, o una terapia de soporte, existiendo, a su vez, un gran número de factores que pueden causar variabilidad entre distintos experimentos. Además, la constatación de hipertensión intracraneal, una de las características principales del FHF en el hombre, no siempre se produce y, en otros casos, tampoco se ha demostrado el aumento de las toxinas implicadas en la EH y el edema cerebral del FHF del hombre. A pesar de ello, las sustancias químicas hepatotóxicas se han utilizado y se usan con frecuencia como modelo de FHF.

El acetaminofeno (paracetamol) es un fármaco de uso común que puede causar daño hepático. La toxicidad del acetaminofeno es dosis-depediente, pero su efecto puede ser exacerbado por el ayuno, fármacos inductores del sistema citocromo P-450 y, de forma especial, por el alcohol. Varios estudios, *in vitro* o *in vivo*, han indicado que la vía de la quinasa N-terminal de c-Jun (JNK) juega un papel fundamental en el efecto tóxico del fármaco (Gunawan y cols., 2006). Sin embargo, los resultados de numerosos estudios en modelos animales en los que se utiliza el acetaminofeno para inducir fallo hepático agudo reflejan resultados no muy homogéneos debido a la existencia de importantes variaciones en el metabolismo hepático de destoxificación del fármaco relacionadas con la especie y con la edad (Gregus y cols., 1988; Rahman y cols., 2002). Cuando el fármaco se encuentra en exceso, se saturan las vías normales de destoxificación y es metabolizado por el citocromo P-450, desencadenándose los procesos de apoptosis y necrosis, infiriendo, por tanto, daño hepático (Sakai y cols., 1992).

La D-galactosamina es una sustancia que metabolizada por la vía de la galactosa en el hígado, produce graves alteraciones en el metabolismo del ARN de los hepatocitos, y finalmente, desencadena la necrosis hepática, por lo que se ha utilizado para desarrollar modelos de FHF (Newsome y cols., 2000). Los resultados obtenidos no son muy homogéneos, el intervalo entre el daño infringido a los animales y la muerte presenta muy poca uniformidad, además, se trata de un producto caro para emplearlo en grandes animales y carece de inocuidad (Rahman y Hodgson, 2000).

El tetraclururo de carbono ha sido ampliamente utilizado como inductor de daño hepático crónico, especialmente como modelo de cirrosis hepática primaria (Pavanato y cols., 2003). Ahora bien, como agente inductor de FHF su uso ha sido muy restringido por ser muy poco reproducible y muy variable interespecíficamente (Rahman y Hodgson, 2000, Tuñón y cols., 2007).

2.2.3 Modelos víricos

A pesar de que la hepatitis vírica es una de las causas más importantes de FHF, el uso de agentes infecciosos para desarrollar modelos animales de FHF ha sido en general muy desafortunado (Khan y cols., 2006) y solamente ratones transgénicos, que sobreexpresan las proteínas del VHC, o ratones BALB/cj infectados con el virus de la hepatitis murina (VHM)-3 han ofrecido alguna luz sobre los mecanismos del FHF inducido por virus (Ando y cols., 1993; Ding y cols., 1997). Sin embargo, estos modelos murinos tienen limitaciones significativas en lo que hace referencia a la ausencia de medidas de la PIC, la principal causa de muerte en el FHF humano, o en los datos sobre las toxinas implicadas en la EH y el edema cerebral, además del pequeño tamaño de los modelos que hacen imposible la prueba de nuevos sistemas de soporte hepático (Newsome y cols., 2000; Rahman y Hodgson, 2000; Tuñón y cols., 2007).

Nuestro grupo ha descrito un modelo animal de FHF producido por la infección experimental de conejos con el VRHD. En este modelo se reproducen los parámetros bioquímicos e histológicos y los signos clínicos más representativos del FHF del hombre (Tuñón y cols., 2003). Se detecta un aumento significativo en las actividades plasmáticas de las transaminasas, lactato deshidrogenasa, y la concentración de bilirrubina. Además, se produce un aumento en la concentración plasmática de los aminoácidos aromáticos con una disminución significativa del índice de Fischer e hipoglucemia, al igual que en el FHF del hombre. Los trastornos de la coagulación observados en este modelo son la disminución de los factores V y VII y la prolongación del TP. En las últimas etapas de la enfermedad los animales presentan signos neurológicos de EH, coma y muerte cerebral. La EH se encuentra invariablemente asociada con el FHF en el hombre, y se considera un criterio esencial para que un modelo animal de FHF sea relevante desde el punto de vista clínico. Este hecho constituye una limitación muy importante en algunos modelos, tales como los basados en la hepatectomía parcial, en los cuales las complicaciones neurológicas, la encefalopatía o la hipertensión intracraneal están raramente presentes. El aumento de la PIC en los animales infectados por el VRHD se acompañó de un incremento de la concentración plasmática de amonio. El examen histológico e inmunohistoquímico reveló, además, amplias áreas de necrosis y de apoptosis (San-Miguel y cols., 2006). Asimismo, se indican incrementos significativos en la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y del TNF- α (Sánchez-Campos y cols., 2004) al igual que se ha descrito en pacientes con FHF (Muto y cols., 1988). El TNF- α es un agente que puede conducir tanto a la proliferación celular como a la apoptosis; su sobreexpresión se relaciona tanto con el índice de apoptosis en el FHF como con la regeneración hepática (Webber y cols., 1998). Por tanto, el conjunto de análisis y observaciones recogidas en los animales infectados por el VRHD refuerza su posible utilización para el estudio de la patogénesis y el tratamiento del FHF, puesto que cumple la mayoría de

los requisitos para ser considerado un buen modelo de FHF (Belanger y Butterworth, 2005; Abrantes y cols., 2012).

2.3 La enfermedad hemorrágica del conejo como modelo animal de fallo hepático fulminante

Durante los años 80, las poblaciones europeas de conejos fueron devastadas por una nueva enfermedad viral caracterizada por ser extremadamente letal y altamente contagiosa, tanto en conejos domésticos como salvajes de la espacie *Oryctolagus cuniculus*. El primer brote de esta nueva enfermedad, denominada Enfermedad hemorrágica del conejo (RHD), tuvo lugar en 1984 en China tras la introducción de conejos de Angora procedentes de Alemania (Liu y cols., 1984). La enfermedad se fue extendiendo en poco tiempo a países como Corea hasta llegar a Italia, en 1986, y propagarse consecuentemente por toda Europa causando una grave reducción en la población (Cancellotti y Renzi, 1991; Yang y cols., 2009). Al mismo tiempo, poblaciones de conejos domésticos de varios países del norte de África se vieron afectadas (Morisse y cols., 1991). En América Central, el primer foco se originó en México debido a una importación de conejos desde China. A pesar de ello, México es actualmente el único país que ha conseguido erradicar totalmente la enfermedad (Gregg y cols., 1991).

Desgraciadamente, la RHD causó importantes pérdidas económicas en el mercado cárnico y en la industria peletera, además de tener un impacto ecológico negativo en las poblaciones de conejos salvajes e indirectamente en sus depredadores (Gregg y cols., 1991; Xu, 1991; Mitro y Krauss, 1993; Delibes-Mateos y cols., 2007). En Australia y Nueva Zelanda, donde el conejo es considerado una importante plaga agrícola, así como una gran amenaza para la flora y fauna endémica (Fenner, 2010), el VRHD fue considerado un agente importante en el control de plagas de conejos y se estableció, por tanto, como bioagente de control en Australia (Cooke, 2002). A pesar de las medidas rigurosas de cuarentena, en 1995 el VRHD llegó al continente probablemente gracias a las corrientes de aire o propagado por insectos. En menos de dos años, el virus se había extendido por todo el sur de Australia, observándose reducciones en las poblaciones de más del 95% en las regiones más áridas (Mutze y cols., 1998). En Nueva Zelanda, sin embargo, después de una minuciosa evaluación e investigación de los riesgos y beneficios de la introducción del virus, el gobierno decidió no utilizarlo como bioagente de control, no obstante, posteriormente el virus fue ilegalmente introducido por terratenientes (Thompson y Clark, 1997; Cooke, 2002).

Actualmente, los brotes de VRHD todavía se producen en casi todos los continentes y provoca tasas de mortalidad significativas, siendo endémico en la

mayoría de los países de Europa, Asia y zonas de África, Australia y Nueva Zelanda (Abrantes y cols., 2012).

2.3.1 Etiología

Los primeros intentos de clasificar el VRHD fueron erráticos, debido principalmente a su naturaleza no cultivable. Finalmente, a principios de 1990 el virus responsable de la RHD fue clasificado como un miembro del género *Lagovirus*, dentro de la familia *Caliciviridae* (Ohlinger y cols., 1990; Parra y Prieto, 1990; Green y cols., 2000). El Comité Internacional de Taxonomía de Virus reconoce cuatro géneros en la familia *Caliciviridae*: *Lagovirus, Vesivirus, Norovirus y Sapovirus,* estos infectan a un amplio rango de animales incluyendo humanos, y causan una gran variedad de enfermedades, tales como gastroenteritis por norovirus y sapovirus, enfermedad hemorrágica por lagovirus, y lesiones vesiculares, infecciones respiratorias y fallos reproductivos por vesivirus (Abrantes y cols., 2012).

El VRHD es un virus ARN de cadena simple con polaridad positiva, sin envuelta, y presenta una cápside icosaédrica de pequeño tamaño, entre 35 y 40 nm de diámetro, compuesta principalmente por una proteína estructural mayoritaria de la cápside de 60 kDa (VP60) (Granzow y cols., 1996; Abrantes y cols., 2012) (Figura 5). El virus es estable en el medio ambiente, donde se disemina con facilidad. Se elimina en heces y secreciones nasales de los conejos infectados. La transmisión de la enfermedad se puede producir tanto por vía oral como nasal, conjuntival, y parenteral; mediante insectos hematófagos, que actúan como vectores eficaces, contacto directo animal-animal, o por medio del alimento o el agua (Xu y Chen, 1989; Ohlinger y cols., 1993; Asgari y cols., 1998).

Los viriones del VRHD contienen ARN genómico y subgenómico (ARNg y ARNsg, respectivamente) (Meyers y cols., 1991, 2000). El ARNsg contribuye normalmente a la producción de altos niveles de componentes necesarios durante las etapas intermedias y avanzadas de la infección, como proteínas estructurales (Miller y Koev, 2000). El ARNg y el ARNsg están poliadenilados en el extremo 3', en la región 5' se encuentran covalentemente unidos a una proteína del genoma viral (VPg) (Machín y cols., 2001). El ARNg consiste en una molécula de simple cadena de polaridad positiva que ingluye dos marcos de lectura abiertos (ORF) 1 y 2: ORF1 codifica una gran poliproteína (Meyers y cols., 1991) que es escindida proteolíticamente por una proteína mayoritaria estructural, la proteína de la cápside VP60 (Boniotti y cols., 1994; Wirblich y cols., 1996; Konig y cols., 1998; Meyers y cols., 2000). Dos proteínas están implicadas en la replicación del ARN viral: una helicasa y una polimerasa ARN dependiente de ARN (RdRp); una proteasa se encarga del procesamiento proteolítico

de la gran poliproteína (Boniotti y cols., 1994; López-Vázquez y cols., 1998). La función de las proteínas no estructurales del VRHD, p16, p23 y p29, es desconocida. Otra proteína viral, VP10, proteína estructural minoritaria codificada por el extremo 3' de ambos ARN en el ORF2, incrementa la replicación viral y promueve la apoptosis, además, disminuye la expresión de VP60. Todo ello sugiere que la VP10 podría regular la replicación del virus y la liberación de viriones desde las células infectadas del hospedador (Liu y cols., 2008; Chen y cols., 2009).



Figura 5. Organización genómica del VRHD (Abrantes y cols., 2012).

2.3.2 Patogenia

Tras la infección, el primer órgano en el que se detecta el virus es el hígado, en el que origina una hepatitis primaria de naturaleza fulminante caracterizada por necrosis focal. Asimismo, se produce daño en el endotelio vascular que origina la puesta en marcha de los mecanismos de la coagulación para su reparación, así como de fibrinolisis, provocando el desarrollo de una CID, y en consecuencia, la aparición de numerosos trombos de fibrina en los vasos de pequeño calibre de muchos órganos, entre otros, el hígado, riñón, pulmón y cerebro. El consumo de los factores de la coagulación junto con la reducción del número de plaquetas y la prolongación de los tiempos de trombina y protrombina conduce a una peor coagulación y a la presencia de hemorragias en diferentes órganos. La CID puede ser responsable de la muerte repentina de algunos animales y juega un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad, siendo la necrosis hepática el factor determinante de la aparición de la CID al inducir una condición de hipercoagulabilidad en la circulación sistémica (Ueda y cols., 1992; Sánchez-Campos y cols., 2004). El síndrome hemorrágico que se observa en los conejos es secundario a la gran disminución en la síntesis de los factores de la coagulación en su forma inactiva como consecuencia de la grave afectación hepática (Duff y cols., 1994). Este hecho es característico de ciertas formas de hepatitis fulminantes humanas (hepatitis A, B y E). De hecho, tanto en la RHD como en el hombre con hepatitis E, se presenta con frecuencia una CID que se ha atribuido a la intervención secundaria de endotoxinas bacterianas después de la afectación vírica de los hepatocitos (Navascués y cols., 1994). Entre las lesiones más características se observa una necrosis con acumulación de pigmentos y de hemosiderina en las células de Kupffer, lesiones que son comparables a las observadas en las hepatitis A, B y E en el hombre (Carman y cols., 1998).

En infecciones experimentales, el virus está presente en los hepatocitos desde periodos postinfección muy tempranos; a las 12 horas postinfección (hpi) se localiza en un 0,03% de los hepatocitos, a las 18 hpi en un 3%, a las 24 hpi en más del 25% y en el periodo transcurrido entre las 36 y las 48 hpi se puede encontrar en más del 50 ó 60% (Prieto y cols., 2000).

El cuadro clínico se corresponde con el de una EH como consecuencia de la afectación del sistema nervioso central por el fallo de la depuración hepática.

Se ha descrito que en esta patología existe un proceso de muerte celular programada, y que la apoptosis es una constante en los animales infectados con el virus de la RHD (Jung y cols., 2000; San Miguel y cols., 2006). El fenómeno afecta principalmente a los hepatocitos, pero también presentan signos típicos de apoptosis los macrófagos y las células endoteliales. La apoptosis de los hepatocitos produce una destrucción parenquimatosa extensa que causa una hepatitis fulminante característica de la RHD. Las células apoptóticas pueden encontrarse en diversos tejidos de conejos infectados por el VRHD desde las 40 hpi, si bien se ve incrementada a partir de las 70 hpi en conejos que mueren espontáneamente (Alonso y cols., 1998).

2.3.3 Cuadro clínico

El periodo de incubación de la enfermedad oscila entre 1 y 3 días y los conejos normalmente sucumben entre las 12 y 36 horas después de la aparición de fiebre (>40°C). Dependiendo de la evolución clínica, la enfermedad puede seguir tres cursos diferentes: sobreaguda, aguda, o subaguda (Xu y Chen, 1989; Marcato y cols., 1991).

En la forma sobreaguda los animales infectados no muestran signos clínicos y mueren rápidamente. Las infecciones agudas están acompañadas de anorexia, apatía y congestión de la conjuntiva palpebral y de síntomas neurológicos como opistótonos, excitación, parálisis y ataxia. Ocasionalmente se manifiestan signos respiratorios (traqueitis, disnea y cianosis) y una descarga nasal espumosa y ensangrentada; lagrimeo, hemorragias oculares y epistaxis. En los estadios finales de la enfermedad los animales aparecen con una gran postración e insensibles a estímulos externos. Dicha postración se acompaña de episodios convulsivos, en los que el animal, que normalmente se encuentra en esta fase en una reacción postural anormal, apoyado sobre un costado, es capaz de elevarse del suelo de la jaula acompañando, en ocasiones, dicho movimiento con un fuerte chillido. También se observa en algunos animales ataxia y parálisis del tercio posterior cuando se intenta colocarlos en una postura natural. La muerte súbita se produce como consecuencia de un fallo múltiple pluriorgánico derivado del edema y de la congestión pulmonar, necrosis adrenocortical, alteraciones circulatorias, renales y necrosis hepática.

La forma subaguda de la enfermedad presenta síntomas clínicos parecidos, pero más leves que en la manifestación aguda y la mayoría de los conejos sobreviven. Los conejos que experimentan infecciones subagudas desarrollan anticuerpos contra el VRHD que les confieren protección a la infección (Patton, 1989).

Además se ha descrito que durante un brote de RHD, un pequeño porcentaje de conejos puede desarrollar una forma crónica de la enfermedad con síntomas tales como una grave y generalizada inctericia, anorexia y letargia. Estos animales normalmente mueren entre 1 y 2 semanas después; sin embargo, los conejos que superan la enfermedad presentan una potente seroconversión (Capucci y cols., 1991; Lavazza y Capucci, 2008).

2.3.4 Lesiones

2.3.4.1 Macroscópicas

Las lesiones observadas en los animales son variables y pueden ser, en ocasiones, no muy evidentes. Los órganos diana donde principalmente actúa el VRHD son el hígado, los pulmones y el bazo. La necrosis hepática, la esplenomegalia, junto con una coagulopatía que origina la presencia de hemorragias generalizadas, son las lesiones más frecuentes (Park y cols., 1995; Alonso y cols., 1998).

Al realizar la necropsia, las lesiones más destacables se presentan en el hígado, tráquea, riñones y pulmones, acompañadas de claros signos de retraso en la coagulación sanguínea, así como de la presencia de abundantes hemorragias y congestiones en forma de petequias y equimosis en la mayor parte de los órganos, especialmente en los pulmones, corazón y riñones, como resultado de una CID masiva (Ueda y cols., 1992). En un elevado número de casos se observa esplenomegalia y tumefacción y hemorragias en el timo; mientras que, sólo en algunos animales es detectable la presencia de ictericia. Cuando la necropsia se realiza en hembras en gestación muertas por la enfermedad es frecuente la presencia de abundantes hemorragias en los fetos y en el útero.

El hígado se encuentra siempre afectado. En las formas de presentación aguda, está hipertrofiado, friable, y tiene una coloración gris-amarillenta; mientras que, en las formas sobreagudas, el hígado está hipertrofiado, presentando una superficie oscurecida y un dibujo lobulillar muy marcado (Marcato y cols., 1991). Los pulmones presentan un aspecto claramente edematoso y congestivo, salpicándose de un número variable de hemorragias en todos sus lóbulos, puntiformes en las formas sobreagudas, y de tamaños variables en las formas de presentación aguda. La tráquea muestra una mucosa muy congestiva y hemorrágica, y con frecuencia está repleta de un exudado espumoso sanguinolento, como consecuencia del edema pulmonar (Abrantes y cols., 2012).

2.3.4.2 Microscópicas

El hígado es el órgano más afectado, mostrando en la mayor parte de los casos evidentes signos de necrosis aguda multifocal y una rápida exudación leucocitaria (hepatitis aguda necrótica). Durante el transcurso de la enfermedad, existe una disminución de linfocitos B y T en el hígado y en el bazo como resultado de una alteración en la respuesta inmune (Xu y Chen, 1989; Marques y cols., 2010). La necrosis muestra una condensación acidófila (degeneración acidófila subcutánea, ocasionalmente con la formación de cuerpos de Councilman) o lisis citoplasmática (Mikami y cols., 1999). Los focos necróticos en muchas ocasiones pueden confluir y formar extensas áreas de necrosis local, principalmente en la periferia de los lóbulos. Dentro de los pequeños focos necróticos se observan a menudo microtrombos intrasinusoidales.

Otras lesiones hepáticas son las debidas a fenómenos de apoptosis, degeneración hidrópica, rotura citoplasmática, esteatosis microvascular, binucleación, megalocitosis de los hepatocitos, y depósito de pigmentos y/o depósitos de hierro. De forma más infrecuente se observa una moderada fibrosis periportal (Marcato y cols., 1991). Se constata, asimismo, la presencia de pequeños focos diseminados de hemorragias intralobulares.

En la tráquea y en los pulmones se observan lesiones edematosas y congestivas asociadas a menudo a la presencia de hemorragias y microtrombos en los capilares. En el resto de los órganos y tejidos es frecuente observar fenómenos de cariorrexis del tejido linfoide (bazo, timo, ganglios, placas de Peyer...) y microtrombos, siendo estos últimos muy frecuentes en los capilares de los glomérulos renales (Rosell y cols., 2002).

2.4 Mecanismos moleculares

La búsqueda de los mecanismos de protección más concretos de diversas sustancias contra el fallo hepático mediante el uso de animales es un campo que no cesa (Saito y cols., 2010). El problema es que en la mayoría de los estudios diseñados para conocer las vías de señalización involucradas en la regeneración hepática se utilizan o modelos *in vivo* de hepatectomía, o modelos *in vitro*, en los que falta la interacción dinámica entre el daño hepático y la reparación celular. Esto depende del equilibrio entre los factores estimuladores, liberados como parte de la respuesta regenerativa y las sustancias inhibidoras (Rutherford y Chung, 2008).

2.4.1 La apoptosis

La apoptosis es un proceso activo de muerte celular descrito por primera vez en Grecia para indicar un deterioro en la función celular. En el hígado este fenómeno fue descrito por Kerr durante un estudio en el cual relató la atrofia del órgano después de la ligadura de la vena porta (Kerr y cols, 1972). En los últimos años, la apoptosis ha comenzado a ser un tema de gran interés, de hecho, el Premio Nobel en Fisiología o Medicina de 2002 fue entregado a Sydney Brenner, H. Robert Horvitz y John E. Sulston por sus descubrimientos sobre la regulación genética de los órganos y la muerte celular programada (Jaryal, 2003).

En contraste con la apoptosis, la necrosis celular se caracteriza por un aumento del tamaño de la célula, y una desorganización de los orgánulos celulares. La necrosis es mediada por la apertura de los poros de transición de la membrana mitocondrial, lo que provoca el colapso del potencial de membrana, y el cese en la formación de ATP. Como resultado, la mitocondria se hincha, y se produce la rotura de la membrana mitocondrial externa, liberándose así proteínas intermembrana, y produciéndose la fragmentación nuclear. Aunque existen otras características importantes de la necrosis, como la depleción masiva de energía, el aumento del calcio intracelular, la formación de especies reactivas del oxígeno y la activación de proteasas no apoptóticas, la más destacada es la inflamación. Cuando la célula necrótica se rompe, tiene lugar una respuesta inflamatoria debida a la liberación de contenidos intracelulares. Por el contrario, la inflamación no es un fenómeno típico de la apoptosis, ya que las células fagocíticas rápidamente engullen las células apoptóticas y, por tanto, previenen la liberación de compuestos nocivos intracelulares (Hinson y cols., 2010; Bantel y Schulze-Osthoff, 2012) (Figura 6).



Figura 6. Diferencias entre la muerte celular por necrosis y por apoptosis.

Sin embargo, a pesar de que la apoptosis y la necrosis se consideran entidades totalmente distintas, un nuevo punto de vista está emergiendo y se ha planteado la idea de que ambos procesos son, con frecuencia, la consecuencia de los mismos factores desencadenantes y de las mismas vías de señalización. Aunque ambos fenómenos puedan ocurrir en paralelo, los mecanismos implicados en la destrucción de las células hepáticas siguen siendo en gran parte desconocidos (Mauriz y cols., 2003; Malhi y cols., 2006).

El hígado está continuamente expuesto a una gran cantidad de sustancias nocivas entre las que podemos incluir toxinas, células tumorales y patógenos como los virus. La inducción de la apoptosis en células infectadas por virus es una importante estrategia del hospedador para protegerse a sí mismo frente a la infección viral (Richard y Tulasne, 2012).

Desde el punto de vista morfológico se observan los siguientes cambios seriados y estereotipados (Patel y Gores, 1995; Kroemer y cols., 2005):

- Las células se encogen y pierden contacto con las células vecinas. Esto es provocado por el movimiento de fluidos fuera de la célula debido a la inhibición del sistema de transporte Na⁺-K⁺-Cl⁻.
- Las cisternas del RE liso se dilatan y pueden fusionarse con la membrana plasmática, pero el resto de orgánulos celulares permanecen intactos. También hay una gran activación de las transglutaminasas.

- La célula se vuelve reconocible por los macrófagos, ya que la fosfatidilserina se desplaza desde la cara interna de la membrana plasmática hacia el exterior.
- La cromatina se condensa y se acumula en la periferia del núcleo.
- Las endonucleasas rompen el ADN en fragmentos oligonucleosomales de unos 180-200 pares de bases (pb).
- La membrana adquiere una apariencia vesicular característica y aparece el denominado "blebbing" (protuberancias o burbujas en la superficie celular).
- Como resultado de las grandes invaginaciones, aparecen los cuerpos apoptóticos. Estos tienen la membrana intacta y pueden ser reconocidos por macrófagos y ser fagocitados.

Los cambios bioquímicos son más precoces y no completamente conocidos. El primer cambio detectado es una modificación en el potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) que origina translocación y liberación del citocromo c (Cit-c) al citoplasma celular; también se produce una redistribución de los lípidos de la membrana así como la activación de proteasas intracelulares, las caspasas.

El mecanismo de apoptosis es extremadamente complejo y sofisticado. Así, múltiples moléculas promueven la muerte celular amplificando efectos en cascada y retroalimentación positiva, todo para asegurar que una vez iniciado, el proceso sea rápido, fatal e irreversible. Como mecanismo de seguridad, la célula produce reguladores para asegurar que pequeñas alteraciones no den lugar a una muerte innecesaria.

2.4.1.1 Vías de la apoptosis

En mamíferos existen dos vías principales respecto a la iniciación de la apoptosis. Aunque ambas vías culminen con el episodio de la muerte celular, debido a la activación de las caspasas, se puede distinguir una vía extrínseca o citoplasmática, y una vía intrínseca o mitocondrial (Figura 7).



Figura 7. Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis.

En la primera vía están implicados receptores de membrana pertenecientes a la superfamilia del TNF. Además de en el proceso de apoptosis, participan en la activación de distintas vías de señalización relacionadas con la supervivencia celular, respuesta inflamatoria, y diferenciación celular (Ashkenazi y Dixit, 1999). La mayoría de estas proteínas son potentes inductores de la vía de supervivencia celular mediada por el factor nuclear NF- κ B, mientras que otros miembros de la superfamilia TNF pueden inducir la vía extrínseca de la apoptosis mediante su unión a los llamados receptores de muerte, como el receptor de TNF de tipo 1 (TNFR1), o Fas/CD95 (Wallach y cols., 1999). La unión específica de ligandos como FasL/CD95L, ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) y TNF- α a sus receptores correspondientes provoca una señal proapoptótica inmediata. Se produce el reclutamiento de la proteína adaptadora FADD y de la caspasa 8 en un complejo de señalización inductor de muerte, donde la caspasa 8, activada por dimerización y escisión autoproteolítica, activa posteriormente a otras caspasas efectoras que desencadenan la apoptosis en las llamadas células de tipo I (Ashkenazi y Dixit, 1998; Bantel y Schulze-Osthoff, 2012).

En muchos tipos celulares, incluyendo a las células hepáticas, sin embargo, sólo pequeñas cantidades de caspasas iniciadoras son activadas en el complejo de señalización inductor de muerte, insuficiente para la muerte celular, por lo que en estas células de tipo II la vía extrínseca debe ser amplificada por la vía intrínseca mitocondrial a través de la interacción de la caspasa 8 con Bid, una proteína proapoptótica de la familia de proteínas del gen del linfoma de células B2 (Bcl-2), que subsecuentemente inicia junto con Bak y Bax, otros miembros de la familia Bcl-2, la liberación de mediadores proapoptóticos mitocondriales (Schwerk y Schulze-Osthoff,

2005). No obstante, la muerte apoptótica de hepatocitos inducida por el receptor Fas/CD95 se retrasa, pero no se inhibe en ratones deficientes en Bak/Bax, lo que indica que los hepatocitos pueden actuar como células de tipo I en ausencia de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 (Hikita y cols., 2011).

Esta vía de apoptosis puede inhibirse por una proteína denominada FLIP (del inglés, *FLICE-inhibitory protein*) que se une a la procaspasa 8. Algunos virus y células producen FLIP y utilizan este inhibidor para proteger a la células infectadas y sanas de la apoptosis (Moumen y cols., 2007).

La vía intrínseca es inicialmente activada por varias señales de estrés que son integradas por la mitocondria. Numerosas moléculas señalizadoras de la apoptosis, así como estímulos patológicos convergen en la mitocondria induciendo la permeabilidad de su membrana externa y la liberación de proteínas que normalmente se encuentran en el espacio intermembrana de la mitocondria. Entre estos factores podemos destacar el Cit-c, que una vez liberado, se une al factor activador-1 de la proteasa apoptotica (Apaf-1), permitiendo la unión del nucleótido desoxiadenosín-trifosfato (dATP). De esta manera se forma el apoptosoma, que recluta y activa a la procaspasa 9, capaz de activar caspasas efectoras, como la caspasa 3 (Kluck y cols., 1997; Susin y cols. 1999; Wang, 2001; van Loo y cols., 2002). Un segundo mecanismo es la generación de un cambio en el potencial transmembrana de la membrana interna mitocondrial, lo que provoca la apertura de canales en la membrana mitocondrial externa permitiendo la salida de proteínas intermembrana (Green y Reed, 1998; Chang y Yang, 2000). La liberación de estos factores está a su vez regulada por la familia de Bcl-2 (Willis y cols., 2003).

2.4.1.2 Familia Bcl-2

De los genes implicados en la supervivencia celular de mamíferos, Bcl-2 fue el primero que se descubrió y por ello le da nombre a la familia. Las proteínas que conforman la familia Bcl-2 coordinan la apoptosis a nivel mitocondrial, y merecen especial atención. Éstas han sido localizadas principalmente en la membrana externa mitocondrial, en el RE, y en la membrana nuclear. La familia Bcl-2 contiene cuatro dominios de homología denominados BH1, BH2, BH3 y BH4, y, en razón de su estructura y función, pueden ser divididas en tres grupos (Reed, 1998). El primero está compuesto en su gran mayoría por miembros antiapoptóticos, como Bcl-2, y Bcl-xL. Los otros dos grupos están formados por proteínas proapoptóticas. Bax, Bak, y Bok/Mtd pertenecen al segundo, y el tercero incluye a Bid, Bad, Bik, Bim, Blk, Bmf, Hrk, BNIP3, Nix, Noxa, Puma, y Bcl-G (Zhang y cols., 2005b). A través de su dominio BH3, las proteínas Bcl-2 pueden interactuar con proteínas multidominio proapoptóticas
estimulando su actividad. Las proteínas proapoptóticas están consideradas los mayores efectores de la apoptosis responsables de la activación de la proteína principal de la membrana externa mitocondrial (MOMP), que, encargada de aumentar la permeabilidad de la membrana, permite la difusión del Cit-c, evento crucial de no retorno, y, como se ha citado anteriormente, la subsecuente activación de las caspasas ejecutoras (David, 2012) (Figura 8). Aunque los miembros de la familia Bcl-2 hayan sido localizados en las estructuras referidas previamente, pueden tener diversas localizaciones subcelulares, ya que mientras los miembros antiapoptóticos suelen presentarse como proteínas integrales en las membranas del núcleo, RE y fundamentalmente la mitocondria, los proapoptóticos se encuentran en el citosol o asociados con el citoesqueleto (Hsu y cols., 1997; Puthalakath y cols., 1999).



Figura 8. Señalización de los miembros de la familia Bcl-2.

2.4.1.3 Caspasas

La familia de proteasas denominadas caspasas constituye el motor de la apoptosis y está implicada en la iniciación, ejecución y regulación de las distintas fases del proceso. Las caspasas son cisteín-proteasas que para ser activadas han de ser proteolizadas de forma secuencial en residuos de aspartato dentro de las secuencias peptídicas de reconocimiento. Para evitar la muerte celular injustificada, las caspasas se expresan como zimógenos inactivos formados por un predominio seguido por dos subunidades con dominio catalítico. Las caspasas operan en cascadas jerárquicas con el fin de amplificar la señal de apoptosis (Los y cols., 1999; Bantel y Schulze-Osthoff, 2012).

En mamíferos se conocen más de 14 caspasas de las cuales no todas intervienen en procesos de muerte celular, de hecho, algunas de ellas participan en los procesos inflamatorios. La primera proteasa encontrada en mamíferos se denominó ICE (del inglés, *interleukin-1* β *-converting enzyme*) o caspasa 1 (cisteína-aspartasa-1) (Alnemri y cols., 1996) y es uno de los pocos miembros de la familia al que no se le ha podido relacionar directamente con el proceso de la apoptosis, sino más bien con el de la inflamación.

En base a su estructura y en el orden que siguen en las vías de muerte celular, las caspasas se pueden dividir en iniciadoras y efectoras de la apoptosis. Las efectoras, tales como las caspasas 3, 6 y 7 escinden diversos sustratos celulares incluyendo proteínas estructurales como la citoqueratina 18 (Bantel y cols., 2000, 2001; Fischer y cols., 2003). Por el contrario, las caspasas iniciadoras: caspasa 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10 y 14 ejercen funciones reguladoras mediante la activación de las caspasas efectoras.

2.4.1.4 Importancia de la apoptosis en el fallo hepático fulminante

Varios estudios han implicado a las propias células del hígado, en combinación con elementos del sistema inmune, como participantes en el proceso destructivo que lleva al fallo hepático, bien sea por necrosis o por apoptosis (Pessayre y cols., 1999).

No se conoce demasiado la implicación de la apoptosis en el parénquima hepático de una persona adulta sana, por el contrario, sí se sabe que la apoptosis está involucrada en numerosas patologías hepáticas: enfermedades hepáticas autoinmunes, hepatitis víricas crónicas, procesos hepáticos asociados al consumo de alcohol, procesos cancerígenos (El Bassiouny y cols., 2008; Mauriz y cols., 2008), y en la patogénesis del FHF, caracterizada por una incontrolada muerte masiva de hepatocitos (Leifeld y cols., 2006; Rutherford y Chung, 2008).

La apoptosis de los hepatocitos es el proceso más importante en el mecanismo molecular del fallo hepático (Eichhorst, 2005), ya que la apoptosis es la primera respuesta celular del hígado ante una amplia variedad de sustancias tóxicas (Doggrell, 2004). La muerte masiva de hepatocitos por apoptosis se ha puesto de manifiesto en diversos modelos de FHF tales como el inducido por galactosamina/lipopolisacárido (Arvelo y cols., 2002), hepatitis por herpes simple (Hashimoto y cols., 2003), el modelo inducido por la concanavalina A (Trautwein y cols., 1998; Kim y cols., 2000) y también el modelo producido por el VRHD (San-Miguel y cols., 2006).

Estudios bioquímicos y patológicos actuales sugieren que la apoptosis representa un papel importante que puede estar determinado por el origen, duración y magnitud de la lesión hepática (Bantel y Schulze-Osthoff, 2012). El tratamiento estándar para la mayoría de los pacientes con FHF es el TH urgente, sin embargo, dado que éste suele ser limitado, se reduce a un cuidado médico intensivo. Es por ello que el conocimiento de la implicación de la apoptosis es esencial para poder actuar utilizando las vías moleculares como dianas terapéuticas, a modo de soporte temporal, en el desarrollo de este síndrome tan grave a la espera del trasplante (Tuñón y cols., 2011a). Entre las posibles estrategias terapéuticas para la inhibición de la muerte celular en el FHF destacan el tratamiento con Ac-VAD-CMK, un inhibidor de caspasas (Schuchmann y Galle, 2001), la inducción hepática específica de los ARN de interferencia pequeños (ARNip) mediante el uso de nanopartículas de liposoma conjugadas con galactosa y dirigidos al gen Fas (Jiang y cols., 2012), la inyección de ARNip de caspasa 8 (Zender y cols., 2003) o el uso de eliminadores de RL tales como salidrosida (Wu y cols., 2009) o edavarona (Miyasou y cols., 2008), o el uso de sustancias tales como N-acetil cisteína (NAC) (San-Miguel y cols., 2006), la cardiotrofina-1 (Tuñón y cols., 2011b) o la melatonina (Laliena y cols., 2012).

2.4.2 El estrés del retículo endoplasmático

El RE es un orgánulo celular esencial en la función y la supervivencia celular donde tiene lugar la síntesis y el plegamiento de las proteínas (Hetz y cols., 2011). Un plegamiento óptimo, dentro del lumen del RE, requiere ATP, calcio y un entorno oxidante para permitir la formación de enlaces disulfuro (Gaut y Hendershot, 1993); cuando estas condiciones se perturban, se reduce la capacidad de plegamiento de las proteínas, que también puede verse alterada por mutaciones en las mismas. Cuando se acumulan las proteínas mal plegadas en el lumen del RE, se produce el estrés del RE. Para superar dicho estrés, las células han desarrollado una serie de estrategias de adaptación y protección que conducen a la activación de lo que se conoce como UPR, del inglés, *Unfolded Protein Response* (Malhotra y Kaufman, 2007).

2.4.2.1 Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)

En mamíferos, la UPR es activada mediante tres proteínas transmembrana que actúan como sensores de estrés del RE: la proteína quinasa dependiente de ARN como quinasa del RE (PERK; del inglés *RNA-dependent protein kinase-like ER kinase*), el factor activador de la transcripción (ATF)6, compuesto por dos isoformas ATF6 α y ATF6 β , y la enzima dependiente de inositol (IRE1), formada también por dos isoformas IRE1 α e IRE1 β (Hetz y cols., 2011).

Estas tres proteínas del RE en condiciones normales están unidas a la proteína de unión a inmunoglobulinas (BiP), también conocida como proteína regulada por glucosa (GRP)78, encargada de mantenerlas en su estado inactivo. Sin embargo, en las células sometidas a estrés del RE, las proteínas desnaturalizadas interaccionan con BiP/GRP78 provocando su disociación de los sensores del estrés, activándose éstos (Gorman y cols., 2012; Zhang y Wang, 2012) (Figura 9).



Figura 9. Repuesta a proteínas mal plegadas (UPR) (Gorman y cols., 2012).

2.4.2.1.1 Vía de señalización de la proteína quinasa dependiente de ARN como quinasa del RE (PERK)

La dimerización y autofosforilación transmembrana de PERK activa su actividad quinasa, permitiendo la fosforilación de la subunidad α del factor 2 iniciador de la traducción eucariótica (eIF2 α), reduciendo, por tanto, la traducción del ARNm y por consiguiente, la síntesis proteica y la entrada de nuevos péptidos nacientes en el RE. Después de la fosforilación de eIF2 α , se produce la traducción selectiva del ATF4. El ATF4 induce la activación transcripcional de chaperonas: la proteína de unión a elementos CCAAT (CHOP), el factor de transcripción XBP1 (del inglés *X-box binding protein-*1), y otros genes involucrados en estrés oxidativo, metabolismo de aminoácidos y muerte celular por apoptosis. La CHOP también induce la expresión del gen inducible por daño en el ADN y detección del crecimiento (GADD34), que se asocia con la proteína fosfatasa 1 (PP1) para desfosforilar al elF2 α en un circuito de retroalimentación negativa, con el fin de reanudar la traducción proteica (Harding y cols., 2000; Malhi y Kaufman, 2011; Zhang y Wang, 2012; Takayanagi y cols., 2013). La fosfatasa constitutiva CreP también promueve la desfosforilación de elF2 α , así como la proteína quinasa R (PKR) puede activar esta vía independientemente de PERK (Zhang y Wang, 2012).



Figura 10. Vía de señalización de PERK (Zhang y Wang, 2012).

2.4.2.1.2 Vía de señalización de la enzima dependiente de inositol 1 (IRE1)

La IRE1 sufre una dimerización y una autofosforilación transmembrana que activa su actividad endorribonucleasa (ARNasa), la cual cataliza la eliminación de un intrón en un ARNm que codifica al factor de transcripción XBP1. Posteriormente, una ligasa empalma el ARNm de nuevo, formándose el factor de transcripción ya activo XBP1s (del inglés, *spliced form of X-box binding protein-1*). XBP1s activa la UPR de forma más potente que su forma no procesada, XBP1u (del inglés, *unspliced form of X-box binding protein-1*), ya que funciona como un potente activador de la transcripción

de los genes que contienen elementos de respuesta a proteínas mal plegadas (UPREs), incluyendo chaperonas, genes lipogénicos y genes relacionados con la degradación asociada al RE (ERAD). La XBP1u codifica un inhibidor de la UPR (Tirasophon y cols., 1998; Malhi y Kaufman, 2011; Ke y Chen, 2012; Zhang y Wang, 2012; Takayanagi y cols., 2013) (Figura 11).



Figura 11. Vía de señalización de IRE1 (Zhang y Wang, 2012).

La IRE1 también recluta al factor 2 asociado al receptor de TNF (TRAF2) y a la quinasa 1 reguladora de la señal apoptótica (ASK1) para mediar la activación de la JNK y del NF- κ B (Zhang y Kaufman, 2008). La asociación de la proteína BiP/GRP78 afina la señalización de IRE1, mientras que las proteínas mal plegadas actúan como ligandos activadores de sensores de estrés del RE (Gardner y Walter, 2011).

2.4.2.1.3 Vía de señalización del factor activador de la transcripción 6 (ATF6)

Al igual que IRE1 y PERK, en las células no sometidas a estrés, el ATF6 se encuentra en la membrana del RE. Cuando se detecta estrés en el RE, la BiP/GRP78 se separa del ATF6, y éste se transloca al aparato de Golgi donde se activa por proteólisis selectiva mediante la escisión del extremo N-terminal por las proteasas del sitio 1 y 2 (S1P y S2P): S1P actúa en el lumen, y S2P en la membrana del Golgi. La fracción citosólica de ATF6 de 50 kDa se libera y entra en el núcleo, donde activa la expresión de genes diana de la UPR junto con los elementos de respuesta a estrés del RE (ERSEs), XBP1, CHOP, GRP78 y GRP94 (Haze y cols., 1999; Szegezdi y cols., 2006; Malhi y Kaufman, 2011; Ke y Chen, 2012; Zhang y Wang, 2012; Takayanagi y cols., 2013) (Figura 12). La fracción del ATF6 escindida forma un heterodímero con XBP1s para inducir la transcripción de las proteínas ERAD (Malhi y Kaufman, 2011).



Figura 12. Vía de señalización de ATF6 (Zhang y Wang, 2012). S1P y S2P: proteasas del sitio 1 y 2.

2.4.2.2 Estrés del retículo endoplasmático y apoptosis

Como ya se ha indicado anteriormente, cuando las células sufren estrés del RE se pone en marcha la UPR. Si el estrés del RE es prolongado o excesivo, y las células no pueden recuperar su funcionamiento normal, se desencadena la muerte celular a través de la vía intrínseca de la apoptosis (Miani y cols., 2013).

Los miembros de la familia Bcl-2 regulan la liberación de moléculas inductoras de apoptosis presentes en el espacio intermembrana de la mitocondria que pueden actuar tanto a nivel mitocondrial (Pan y cols., 1998) como a nivel de las membranas del RE y del núcleo (Ng y cols., 1997). En la membrana del RE, estos regulan la homeostasis del calcio. La liberación del calcio desde el RE puede activar a calpaínas que pueden activar proteolíticamente a la caspasa 12, encargada de modular la apoptosis (Malhi y Kaufman, 2011; Gorman y cols., 2012) (Figura 13). La absorción del calcio mitocondrial induce permeabilidad en su membrana y la liberación del Cit-c, factor inductor de apoptosis, ya que, como se ha indicado anteriormente, permitirá la activación de la

procaspasa 9 y ésta a su vez activará a la caspasa 3, ejecutora de la apoptosis (Wang, 2001; van Loo y cols., 2002).



Figura 13. Apoptosis inducida por estrés del RE (Hetz y cols., 2011).

La proteína quinasa JNK forma parte de la familia de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), y se activa mediante la IRE1 a través de la vía del factor asociado al receptor del TRAF2 y la quinasa ASK1. La JNK activa a las proteínas proapoptóticas Bim y Bak, e inactiva a la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Malhi y Kaufman, 2011; Gorman y cols., 2012). Se sabe también que TRAF2, además de tener un papel en la ruta de señalización de la JNK, interactúa con la procaspasa 12 y promueve su activación en respuesta al estrés del RE (Yoneda y cols., 2001) (Figura 13).

La proteína CHOP se activa principalmente por el ATF4, pero también interviene el ATF6 que, en respuesta al estrés del RE, induce la expresión de la proteína proapoptótica Bim e inhibe a Bcl-2 (Gorman y cols., 2012). Además, mejora la expresión del GADD34 a través de la posterior desfosforilación del elF2 α , reanudándose así la traducción (Marciniak y cols., 2004). La entrada de proteínas al RE para someterse a plegamiento oxidativo en condiciones de estrés del RE puede generar especies reactivas del oxígeno, por lo tanto, el plegamiento oxidativo de las proteínas y la disfunción mitocondrial se asocian con la acumulación de especies reactivas del oxígeno, lo que producirá un daño celular en cascada (Malhi y Kaufman, 2011) (Figura 13).

Como se mencionó anteriormente, la activación de las vías de PERK e IRE1lphapueden también regular la vía de señalización NF-κB-IKK mediante la activación de la quinasa IkB (IKK) o a través de la degradación de p65 durante el estrés del RE. La vía ATF6 puede regular la actividad del NF-κB. Todas estas vías de señalización pueden desencadenar apoptosis durante un excesivo o prolongado estrés del RE. Las diferencias entre la activación de las tres vías de la UPR parecen determinar la apoptosis (Ron y Walter, 2007). Por ejemplo, el continuo estrés del RE puede reducir la actividad de la IRE1 y del ATF6 y activar, a su vez, a la PERK, permitiendo la apoptosis (Lin y cols., 2007). De forma similar, la redución de la actividad de la endorribonucleasa de la IRE1 puede suprimir su papel protector a través de la producción de XBP1 y provocar la activación de JNK o la liberación de mediadores apoptóticos (Hetz y cols., 2006). La degradación del ARNm localizado en el RE mediante la IRE1 α puede ser un importante mecanismo del estrés generado en el orgánulo para determinar la muerte o supervivencia celular (Han y cols., 2009), sin embargo, no se conocen a la perfección las funciones específicas de cada factor iniciador de las ramas de la UPR en cuanto al reconocimiento y respuesta a diferentes tipos de estrés del RE. Asimismo, otros factores, además de la carga proteica, como la interrupción de la homeostasis del calcio del RE, patógenos, lípidos y toxinas, pueden inducir estrés del RE a través de la activación de la UPR, permitiendo la apoptosis (Wang y cols., 2013c).

2.4.3 Autofagia. Mecanismo de adaptación frente al estrés celular

El término "autofagia" deriva de las raíces griegas *auto-*, uno mismo, *phagos-*, comer. El fenómeno fue observado por primera vez hacia mediados del siglo XX, cuando Clark Jr. detectó unas extrañas estructuras estudiando riñones de ratón recién nacido con el microscopio electrónico (Clark, 1957). No fue hasta diez años más tarde cuando Christian de Duve acuñó el término: observó la degradación mitocondrial y de otras estructuras intracelulares en los lisosomas de hígado de rata perfundido con glucagón, hormona pancreática que inducía autofagia (Ashford y Porter, 1962; Deter y De Duve, 1967). La autofagia es un proceso altamente conservado en la evolución.

Actualmente se han identificado en levaduras 32 genes diferentes relacionados con la autofagia (Atg), además, la gran mayoría se han encontrado en mohos mucilaginosos, plantas, gusanos, moscas y mamíferos (Mizushima, 2007).

La homeostasis celular requiere de un fino equilibrio entre la síntesis y degradación de macromoléculas (proteínas, lípidos, ADN, ARN, segundos mensajeros, orgánulos, etc.). La degradación de proteínas puede llevarse a cabo a través de dos vías principales: la proteosomal y la autofágica (Klionsky, 2007). La autofagia es responsable no sólo de la degradación de proteínas, sino también del reciclaje y degradación de orgánulos y material citoplasmático (Mizushima y Klionsky, 2007).

Es un proceso importante en el equilibrio de la fuente de energía en momentos críticos del desarrollo en respuesta al estrés nutricional. De hecho, la vía de la autofagia fue identificada como un mecanismo inducido por la falta de nutrientes celulares. La autofagia es considerada un mecanismo de supervivencia y juega un papel de limpieza celular eliminando no sólo agregados proteicos, proteínas mal plegadas, y orgánulos dañados, sino también patógenos intracelulares. Por todo ello, la autofagia es considerada un mecanismo de supervivencia.

En metazoos, la maquinaria autofágica ha evolucionado para llevar a cabo diversas funciones reguladoras y otras relacionadas con el transporte intracelular. En respuesta a infecciones víricas, la maquinaria autofágica se encarga de la degradación de los virus, e irrumpe en el transporte de los patógenos virales a los endosomas; además, actúa sobre el procesamiento viral para la presentación de antígenos de superficie celular al complejo mayor de histocompatibilidad y transporta proteínas antivirales a lugares de replicación viral. Los componentes de la maquinaria autofágica contribuyen en la defensa antiviral: primero, la autofagia proporciona componentes citosólicos virales a los compartimentos endolisosomales; segundo, las proteínas Atg actúan de forma independiente, como subgrupos o colectivamente; y tercero, la especificidad de la autofagia y de la maquinaria autofágica se debe a la capacidad que poseen algunos de sus componentes adaptadores para reconocer y señalar selectivamente los factores desencadenantes de la misma (Yordy y cols., 2013).

En contraste con el papel protector frente a la infección viral, la maquinaria autofágica podría incluso promover la replicación de algunos virus, ya que, como se indicará más adelante, existen algunos virus que han desarrollado estrategias para evadir, combatir o emplear el mecanismo autofágico en su propio beneficio (Dreux y Chisari, 2009).

Por otra parte, la autofagia está implicada en numerosos procesos celulares: promueve la senescencia celular, protege contra la inestabilidad del genoma, previene la necrosis y es importante en la prevención de enfermedades como cáncer, cardiomiopatía, diabetes, enfermedades hepáticas, neurodegenerativas, autoinmunes e infecciones (Glick y cols., 2010).

2.4.3.1 Tipos de autofagia

Anteriormente se había considerado a la macroautofagia, microautofagia y a la autofagia mediada por chaperonas como los únicos tres tipos de autofagia existentes en mamíferos encargados de la degradación proteolítica de componentes citosólicos en el lisosoma (Mizushima y cols., 2011) (Figura 14), sin embargo, recientemente se han descubierto dos nuevos mecanismos mediante estudios en cerebros de ratones denominados "RNautofagia" y "DNautofagia" (Fujiwara y cols., 2013a,b).

La macroautofagia entrega la carga citoplásmica en el lisosoma a través de un intermediario, una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma, la cual se forma a partir de una membrana de aislamiento, denominada fagóforo, que secuestra una pequeña porción de citoplasma. Una vez formado, el autofagosoma se fusiona con el lisosoma para formar un autolisosoma.

En la microautofagia, por el contrario, los componentes citosólicos son directamente tomados por el lisosoma mediante invaginación de la membrana lisosomal.

La autofagia mediada por chaperonas no implica reorganización de la membrana, es decir, las proteínas diana son translocadas a través de la membrana lisosomal en un complejo con proteínas chaperonas que son reconocidas por el receptor lisosomal de membrana asociado a la proteína de membrana lisosomal tipo 2A (LAMP)-2A, provocando su desplegamiento y degradación.



Figura 14. Diferentes tipos de autofagia (Cuervo, 2010). AMC: autofagia mediada por chaperonas.

La RNautofagia y DNautofagia son dos mecanismos de autofagia en los que el ARN y el ADN, respectivamente, son tomados directamente por los lisosomas y posteriormente degradados. La proteína LAMP-2C, una variante de la LAMP-2A, se une al ARN y al ADN actuando como receptor en sendas vías. Ambos procesos son dependientes de ATP y se consideran sistemas conservados evolutivamente en metazoos (Fujiwara y cols., 2013a,b).

La macroautofagia es la mejor caracterizada y se la ha relacionado tanto con la inmunidad adaptativa como con la innata (Deretic y Levine, 2009). Nos centraremos, por tanto, en este tipo de autofagia debido al reciente interés por el papel que desempeña en la prevención de enfermedades, y nos referiremos a ella con el término general de "autofagia".

2.4.3.2 La maquinaria autofágica

La autofagia es inducida en condiciones basales por una escasez de nutrientes celulares y regulada por varias señales fisiológicas, como el nivel de energía celular, estrés del RE, hipoxia y estrés oxidativo (Kroemer y cols., 2010). El proceso comienza con la formación de una membrana de aislamiento denominada fagóforo, cuyo origen en mamíferos ha sido conocido recientemente. En primer lugar se pensó que esta membrana era derivada de la bicapa lipídica y estaba formada probablemente por el RE, mitocondrias y membrana plasmática (Tooze y Yoshimori, 2010; Mizhusima y cols., 2011). Actualmente se ha descubierto que la formación de los autofagosomas se inicia en el lugar de contacto entre el RE y la mitocondria (Hamasaki y cols., 2013). El fagóforo se expande para engullir la carga intracelular citoplasmática que queda englobada en una estructura de doble membrana denominada autofagosoma. El contenido del autofagosoma madura mediante la fusión de su membrana externa con el lisosoma, produciéndose la degradación de la carga intracelular y de su membrana interna gracias a las proteasas lisosomales, que, junto con los transportadores, son los encargados de expulsar al citoplasma los productos de degradación. Por tanto, la autofagia puede ser considerada un proceso de reciclaje del metabolismo que contribuye a restaurar la homeostasis y a la renovación celular mediante la formación de nuevas macromoléculas (Kroemer y cols., 2010).

En la última década del siglo XX, gracias a estudios genéticos realizados en levaduras, se identificaron unos 35 genes Atgs, muchos de los cuales están conservados en mamíferos (Kraft y Martens, 2012). De todos ellos, 15 genes Atg codifican la maquinaria fundamental para la biogénesis de las membranas relacionadas con el proceso autofágico y se encuentran clasificados en seis subgrupos (Zavodszky y cols., 2013).

Los genes Atg llevan a cabo un complejo proceso molecular que consta de cinco etapas clave (Glick y cols., 2010) (Figura 15):

- 1. Formación del fagóforo.
- 2. Conjugación de los complejos de tipo ubiquitina: Atg12-Atg5-Atg16L1 y LC3-PE.
- 3. Procesado de la LC3 y su inserción en la membrana del fagóforo.
- 4. Captura de la carga selectiva para su posterior degradación.
- 5. Fusión del autofagosoma con el lisosoma.



Figura 15. Circuito molecular y vías de señalización que regulan la autofagia (Glick y cols., 2010).

2.4.3.2.1 La formación del fagóforo está bajo control de múltiples señales

En células de mamífero, la membrana del fagóforo parece iniciarse primariamente en el lugar de contacto entre el RE y la mitocondria, donde Atg14, marcador de preautofagosomas, en condiciones de déficit de nutrientes, permanece anclado hasta que la formación del autofagosoma se completa (Hamasaki y cols., 2013). La elongación del fagóforo es un proceso regulado por un gran número de complejos macromoleculares o grupos de proteínas.

Complejos ULK

Al menos dos quinasas ULK, ULK1 (del inglés, *unc*-51-*like kinase* 1) y ULK2, están involucradas en la regulación de la autofagia en mamíferos (McAlpine y cols., 2013). Las quinasas ULK1 y ULK2 forman parte de un gran complejo, cuya formación es independiente del estado nutricional de la célula. Este complejo incluye al gen de la autofagia 13 en mamíferos (mAtg13) y a la proteína FIP200 (proteína de 200 kDa de interacción con la familia de las quinasas de adhesión).

El complejo de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTORC)1 regula directamente el complejo mediante la fosforilación de mAtg13, ULK1 y ULK2; las quinasas ULK1 y ULK2 fosforilan a mAtg13 y FIP200 suprimiendo la expansión de la membrana autofágica en condiciones favorables de nutrientes. La inactivación del mTORC1, mediante tratamiento con rapamicina o en condiciones de déficit de nutrientes, permite la desfosforilación de mAtg13, ULK1 y ULK2, y por tanto, ULK1 y ULK2 fosforilan a FIP200, induciéndose la autofagia (Hosokawa y cols., 2009) (Figura 16). Existe otra proteína, Atg101, que interactúa de forma dependiente con ULK1 y mAtg13 y es esencial para la autofagia (Mercer y cols., 2009).



Figura 16. Regulación de la autofagia a través de los complejos ULK (Yang y Klionsky, 2010).

Complejos de las fosfatidil inositol-3 quinasas de clase III

La familia de las fosfatidil inositol-3 quinasas (PI3K) de clase III, sobre todo la Vps34 (proteína de clasificación vacuolar 34 de humanos) y su unión a Beclina-1, es clave en la formación del fagóforo. Vps34 es la principal fuente de fosfatidil inositol-3-fosfato (PI3P) durante la autofagia, esencial para la elongación del fagóforo y para el

reclutamiento de otras proteínas Atg (Xie y Klionsky, 2007; Devereaux y cols., 2013). Recientemente se identificó al Atg14 como un constituyente más del complejo Vps34-Beclina-1. El complejo Atg14 está formado por las proteínas Vps34, Beclina-1 y p150; sin embargo, el gen asociado a la resistencia a la radiación ultravioleta (UVRAG), encargado de unir los componentes del complejo Vps34-Beclina-1, no forma parte de él. El Atg14 se localiza en el fagóforo y, a diferencia del UVRAG, presente sobre todo en endosomas tardíos, es esencial desde las fases tempranas del proceso para la formación del autofagosoma (Figura 17). Una sobreexpresión del Atg14 estimula la actividad de la proteína Vps34 e induce autofagia. Por tanto, el complejo Vps34-Beclina-1 tiene por lo menos dos funciones distintas según se unan a él Atg14 o UVRAG (Itakura y Mizushima, 2009).



Figura 17. Complejos de las fosfatidil inositol-3 quinasas de clase III.

Existen otras proteínas reguladoras de la autofagia; la endofilina B1 (Bif-1), y la molécula de activación en la autofagia regulada por Beclina-1 (Ambra-1) actúan induciendo el mecanismo autofágico. La Bif-1 interactúa con la Beclina-1 a través del UVRAG y funciona como un inductor de quinasas PI3K de clase III. En respuesta a la ausencia de nutrientes, la Bif-1 se sitúa en los autofagosomas, donde colocaliza con el Atg5 y la proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3 (LC3), además, un descenso en la expresión de la Bif-1 inhibe la formación de autofagosomas (Fimia y cols., 2007; Takahashi y cols., 2007). Moléculas como Bcl-2 actúan como reguladores negativos de la autofagia. El Bcl-2 interactúa con la Beclina-1 e inhibe el proceso, como se indicará más adelante (Figura 17).

2.4.3.2.2 Conjugación de los complejos de tipo ubiquitina.

Dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina son esenciales para esta etapa. En el primero, el Atg12 se une covalentemente al Atg5 y juntos forman un complejo con el Atg16L1, el cual se sitúa en el exterior de la membrana del autofagosoma. El segundo sistema ubiquitina lo constituye la LC3, que se une a la fosfatidiletanolamina (PE) en la membrana interna y externa del autofagosoma. A diferencia del complejo Atg12-Atg5-Atg16L1, que es reciclado, el complejo LC3-PE permanece asociado con la membrana interna del autofagosoma, convirtiéndole en un importante marcador de autofagia (Kroemer y cols., 2010; Mehrpour y cols., 2010). La conjugación de Atg5-Atg12 no depende de la activación de la autofagia, y una vez que el autofagosoma está formado, el complejo Atg12-Atg5-Atg16L1 se disocia de la membrana haciendo al conjugado Atg5-Atg12 un marcador relativamente pobre de autofagia (Barth y cols., 2010) (Figura 18).



Figura 18. Conjugación de los complejos tipo ubiquitina.

2.4.3.2.3 Procesado de LC3

La proteína LC3 es expresada en la mayoría de los tipos celulares como una proteína citosólica que tras la inducción de la autofagia es proteolíticamente escindida por el Atg4 para generar LC3-I. Una vez activada es transferida al Atg3 antes de que la PE sea conjugada para generar LC3-II. El reclutamiento y la integración de LC3-II en el fagóforo depende del complejo Atg5-Atg12 (Figura 19). La LC3-II se encuentra tanto en

la membrana interna como en la externa del autofagosoma, donde interviene en la fusión de las membranas, o bien se encarga de seleccionar la carga para su posterior degradación. La síntesis y el procesamiento de la LC3 se encuentran aumentados durante la autofagia convirtiendo a esta proteína en un marcador clave de los niveles de autofagia celular (Barth y cols., 2010).

Una vez formado el autofagosoma, la LC3-II es eliminada de su membrana por el mismo Atg4. Se desconoce el mecanismo por el cual se regula la actividad del Atg4 para que no active a la LC3 fuera de contexto o elimine la LC3-II antes de que los autofagosomas estén formados (Fujita y cols., 2008).



Figura 19. Procesado de LC3.

2.4.3.2.4 Selección del contenido a eliminar

La autofagia es el mayor proceso catabólico celular responsable de la degradación de proteínas citosólicas, RE, peroxisomas y mitocondrias. La degradación de proteínas citosólicas no es un proceso aleatorio, y es mediado por la proteína "sequestrosoma-1" (p62/SQSTM1) (Bjørkøy y cols., 2005). Esta proteína multifuncional tiene la capacidad de capturar proteínas ubiquitinadas y fijarlas a la LC3-II en el autofagosoma. La Nrb-1 también posee la capacidad de unirse a proteínas ubiquitinadas y puede coactuar con la p62 o interaccionar de forma independiente. Alfy, otra proteína de unión a ubiquitina, fija a las proteínas en el autofagosoma uniéndose al PI3P y al Atg5, además de a la p62. La interacción entre las proteínas LC3-II, p62, Nbr-1 y Alfy permite la autofagia selectiva de ubiquitinados solubles y agregados proteicos (Abounit y cols., 2012).

2.4.3.2.5 Fusión con el lisosoma

Una vez seleccionada la carga a eliminar, los autofagosomas se fusionan con los endosomas y los lisosomas, facilitando de este modo la degradación de su contenido (Figura 20). La miosina VI, junto con sus proteínas adaptadoras NDP52, optineurina, T6BP y Tom1 regula este proceso. Una disminución en los niveles de la Tom1, presente en los endosomas, provoca la reducción de la liberación de la carga endocítica autofagosomal bloqueando la fusión autofagosoma-lisosoma. Sin embargo, la miosina VI libera las membranas endosomales donde se sitúa la Tom1 mediante el acoplamiento de NDP52, T6BP y optineurina, promoviendo así la maduración del autofagosoma y su fusión con el lisosoma (Tumbarello y cols., 2012).



Figura 20. Fusión del autofagosoma con el lisosoma (He y Klionsky, 2009).

2.4.3.3 Vías de señalización implicadas en la regulación de la autofagia

Como se ha expuesto anteriormente, la autofagia es activada en respuesta a diversas condiciones fisiológicas, patológicas, y/o a diferentes procesos de estrés.

2.4.3.3.1 Regulación mediante nutrientes, mTOR

La escasez de nutrientes, el estrés, o una reducida disponibilidad de factores de crecimiento provocan en las células una señal de alarma que hace que ajusten su metabolismo para sobrevivir a las condiciones adversas. Una respuesta temprana en el ajuste del metabolismo celular implica la inhibición del crecimiento y la inducción del proceso de autofagia con el fin de optimizar el suministro limitado de energía. La autofagia, como proceso de movilización intracelular de reservas de nutrientes, contribuye a la supervivencia celular durante las condiciones desfavorables de crecimiento.

La inducción de la autofagia en células eucariotas de mamífero se realiza a través de la inhibición de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), una proteína quinasa altamente conservada en la evolución. La mTOR actúa como regulador central del crecimiento celular, y juega un papel clave en la red de señales que coordinadamente regulan el equilibrio entre el crecimiento celular y la autofagia en respuesta al estado nutricional, factores de crecimiento y diversas señales de estrés. La quinasa mTOR regula de forma negativa la autofagia inhibiendo a la ULK1 mediante la interacción con el Atg13 y la FIP200. El complejo ULK-Atg13-FIP200 recluta y organiza otras proteínas para el desarrollo del autofagosoma. En respuesta a la insulina o a factores de crecimiento, la fosforilación de Akt, inducida por la PI3K de clase I, activa a mTOR inhibiéndose la autofagia. Por el contrario, durante la escasez de nutrientes, la activación de la proteína quinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK) inhibe a mTOR, e induce autofagia (Jung y cols., 2010). El mecanismo autofágico es altamente inducido cuando los niveles de nutrientes son escasos. Actúa como un componente clave en la respuesta del organismo a nivel celular a la falta de nutrientes, promoviendo la supervivencia celular hasta que exista de nuevo disponibilidad en el medio (Glick y cols., 2010) (Figura 21).

La mTOR se une a varias proteínas para formar dos complejos distintos: mTORC1 y mTORC2. El mTORC1 tiene como función principal regular la autofagia (Yang y Klionsky, 2009); integra señales activadoras que inhiben la autofagia a través de la vía de la quinasa Akt. Por otro lado, el mTORC2 está implicado en la regulación de la fosforilación y la activación de la Akt, de la proteína quinasa C, y de la proteína quinasa 1 inducida por suero y glucocorticoides (Sarbassov y cols., 2006; García-Martínez y Alessi, 2008). Debido a que Akt regula positivamente a mTORC1, sería razonable especular que el mTORC2 actúa como un regulador negativo de la autofagia, sin embargo, la inducción de la autofagia mediante inhibición de mTORC2 está mediada principalmente por FoxO3 (del inglés, *Forkhead box* O3), un factor de transcripción de Akt, implicado además, en la expresión genética autofágica (Mammucari y cols., 2007). Investigaciones recientes afirman que la proteína quinasa mTOR controla procesos anabólicos como parte de los complejos mTORC1 y mTORC2. Ambos están implicados en un mecanismo regulador de retroalimentación negativa en el cual la estimulación de mTORC1 inactiva a mTORC2 a través de la fosforilación inhibidora de Sin1, componente de mTORC2 (Xie y Proud, 2013).



Figura 21. Regulación de la autofagia mediante nutrientes (Alers y cols., 2012).

2.4.3.3.2 Autofagia y estrés del retículo endoplasmático

La autofagia inducida por el estrés del RE juega un papel fundamental en la conservación de la homeostasis aliviando el estrés celular, ya que el RE está relacionado con los dos principales procesos de degradación en células eucariotas: la vía ubiquitina-proteasomal y la vía autofagia-lisosomal (Rubinsztein, 2006). Varios tipos de estrés, extra e intracelulares, potencialmente inducen autofagia, proceso importante para que el organismo se adapte o sobrepasase condiciones desfavorables. Estudios recientes han proporcionado información sobre los mecanismos moleculares que regulan la autofagia en respuesta a diferentes señales de estrés (He y Klionsky, 2009).

Como ya se ha expuesto anteriormente, el estrés del RE es una de las respuestas típicas celulares ante una infección viral. Se trata de un importante mecanismo cuya función principal es mantener la fisiología de las células sanas mediante la disminución de la síntesis de proteínas a través de la UPR manteniendo la homeostasis (Schröder, 2008). La autofagia es activada tras la respuesta al estrés del RE como mecanismo de defensa para la supervivencia, además, algunos grupos han descrito la existencia de una relación entre los tres sensores de la UPR y la formación de autofagosomas (Ogata y cols., 2006; Ding y cols., 2007). Es sabido, además, que algunos virus, independientemente de la naturaleza de su genoma, inducen la

respuesta al estrés del RE, que a su vez estimula las vías de señalización de la UPR para inducir el proceso autofágico, por lo que la activación de la UPR es responsable de la subsecuente activación de la autofagia (Shinohara y cols., 2013).

En células de mamífero, el descenso en la actividad del regulador BiP, mediante el uso de ARNips, inhibe la formación de autofagosomas inducida por el estrés del RE y la escasez de nutrientes, pero no afecta a la conversión de la LC3-I a su forma LC3-II, sugiriendo que BiP es un factor esencial para la autofagia que interviene en la expansión del fagógoro. Al ser un proceso artificial basado principalmente en el descenso de la actividad de BiP, que espontáneamente activa la UPR e induce la conversión de LC3, dificulta diferenciar entre la verdadera implicación de BiP y de la UPR en la inducción de la autofagia (He y Klionsky, 2009; Li y cols., 2008). Otro indicio de que la autofagia está relacionada con el estrés del RE es que la fosforilación de eIF2 α por parte de PERK es requerida para que se produzca la conversión de LC3 y la degradación de proteínas mutantes en el RE (Kouroku y cols., 2007). Por tanto, se puede concluir que la infección viral induce estrés del RE, y que la autofagia es inducida a través de la UPR, incluyendo la activación de las vías de señalización de PERK, IRE1, y ATF6 (Sir y cols., 2008) (Figura 22).



Figura 22. Autofagia mediada por el estrés del RE.

2.4.3.3.3 Autofagia y apoptosis

El proceso de autofagia está ligado estrechamente al mecanismo de muerte celular programada. La autofagia desempeña un papel doble, puede inhibir la apoptosis, efecto antiapoptótico, o causar la muerte celular, efecto proapoptótico; por

otro lado, la apoptosis puede inhibir el proceso autofágico (Wang y cols., 2013d). La autofagia tiene una importante función en la determinación del destino de las células infectadas por virus (Tovilovic y cols., 2014), ya que algunos estudios han demostrado que el proceso autofágico puede contribuir a la muerte de éstas a través de mecanismos apoptóticos (Xi y cols., 2013), o bien, que la autofagia puede prolongar la supervivencia de las células infectadas bloqueando la respuesta apoptótica (Joubert y cols., 2012; Tovilovic y cols., 2013).

Anteriormente se ha definido a la autofagia como un mecanismo de supervivencia en diferentes contextos, incluyendo la escasez de nutrientes y el estrés del RE; este hecho es controvertido, pues la autofagia actúa como un proceso citoprotector que está implicado en la muerte celular. En respuesta a la mayoría de las formas de estrés celular, la autofagia actúa con un papel citoprotector, ya que la inhibición, o la disminución en la actividad de los genes Atg acelera, más que retrasa, la muerte celular (Levine y Yuan, 2005; Maiuri y cols., 2007b). Sin embargo, en ciertas condiciones en las que los principales marcadores autofágicos se encuentran sobreexpresados, la autofagia puede permitir la muerte celular posiblemente a través de la apoptosis o como resultado de la incapacidad de las células de sobrevivir a degradaciones no específicas de grandes cantidades de contenido citoplasmático (Pattingre y cols., 2005). Cabe señalar que la mayoría de los casos de muerte celular dependiente de los genes Atg ocurren en células deficientes en apoptosis, sugiriendo que el proceso de autofagia como ruta hacia la muerte celular podría ser una opción de último recurso (Levine y Yuan, 2005).

La relación entre la autofagia, una vía cuya función principal es la supervivencia celular, y la apoptosis, mecanismo que ineludiblemente conduce a la muerte celular, es compleja. Las dos vías están reguladas por factores comunes y cada una puede modificar y regular la actividad de la otra (Levine y Yuan, 2005; Maiuri y cols., 2007b). Muchas señales originalmente estudiadas en el contexto de la activación de la apoptosis inducen autofagia, mientras que las señales que inhiben la apoptosis también inhiben la autofagia (Gozuacik y Kimchi, 2007). Una de las uniones de estas dos vías es a través del Atg5, ya que puede sufrir una escisión mediada por calpaína para generar un fragmento apoptótico que participa en la vía intrínseca mitocondrial (Yousefi y cols., 2006).

La familia de proteínas Bcl-2 juega un doble papel en la regulación de la apoptosis. Proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w y Mcl-1 pueden inhibir la autofagia, mientras que proteínas proapoptóticas con el dominio de homología BH3, como BNIP3, Bad, Bik, Noxa, Puma y BimEL, son capaces de inhibir el proceso (Levine y cols., 2008). Bcl-2 actúa como regulador negativo de la autofagia: interactúa con la Beclina-1 alterando a su vez la interacción de ésta con la Vps34. Por tanto, la actividad de la Beclina-1 en la autofagia es inhibida por la interacción con Bcl-2 en el RE. Existen

al menos tres mecanismos diferentes que pueden ocurrir con el fin de evitar que la Beclina-1 interaccione con sus inhibidores: Bcl-2/Bcl-xL (Figura 23).



Figura 23. Inhibición de la autofagia por miembros de la familia Bcl-2 (Yang y Klionsky, 2010).

- El dominio de homología BH3 de proteínas proapoptóticas, como Bad, puede interrumpir competitivamente la interacción de Beclina-1 y Bcl-2/Bcl-xL (Maiuri y cols., 2007a).
- En condiciones de estrés celular por déficit de nutrientes, la interacción de la Beclina-1 con sus inhibidores es interrumpida mediante la fosforilación de Bcl-2 por parte de JNK1, permitiendo la autofagia (Wei y cols., 2008).
- 3. Un hallazgo reciente muestra que la activación de la Beclina-1 para inducir autofagia implica la fosforilación de ésta por parte de la proteína quinasa asociada a muerte (DAPK). La quinasa DAPK fosforila a la Beclina-1 en el residuo Thr119, localizado en una posición crucial del dominio BH3 de la Beclina-1, provocando la disociación de su inhibidor, Bcl-xL, y por consiguiente, induciendo el mecanismo autofágico (Zalckvar y cols, 2009).

Cabe destacar que el Bcl-2 juega un doble papel en la determinación de la viabilidad celular dependiendo de su localización en la célula: puede promover la supervivencia celular en la mitocondria inhibiendo la liberación del Cit-c, y bloqueando, por tanto, la apoptosis; o bien es capaz de inhibir la autofagia en el RE mediante la interacción con la Beclina-1 y desencadenar una muerte celular no apoptótica. Por tanto, el equilibrio entre autofagia y apoptosis está determinado por la respuesta celular a diferentes señales de estrés (Pattingre y cols., 2005).

2.5 El papel de la autofagia en la infección viral

La autofagia principalmente tiene un papel fundamental en la supervivencia celular durante la adaptación a condiciones de crecimiento desfavorables o al estrés celular mantenido. Además, el mecanismo autofágico interviene en la inmunidad innata mediante la degradación de patógenos intracelulares, por lo que si el proceso se inhibe, se produciría un aumento en la replicación y en la virulencia de diferentes virus, tales como el VHS-1 o el VEV (Maier y Britton, 2012). Sin embargo, muchos virus, incluyendo el VHC, el DENV, o el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), han desarrollado mecanismos para evadir la autofagia y, en algunos casos, logran ser incluso más subversivos beneficiándose de la respuesta autofágica con el fin de aumentar su replicación y liberación viral (Blanchet y cols., 2010; Crawford y cols., 2012).

2.5.1 Regulación del mecanismo autofágico por infección viral

2.5.1.1 Inducción de la formación de vesículas autofágicas en células infectadas

Un amplio espectro de virus ARN o ADN induce la acumulación de autofagosomas. Uno de los primeros sensores que regulan la autofagia es la quinasa citoplasmática PKR que actúa como sensor de ARN viral de doble cadena. Por ejemplo, la fosforilación de eIF2 α por medio de la PKR es esencial para la inducción de la autofagia mediada por el VHS-1 (Tallóczy y cols., 2002; García y cols., 2006). Aunque el mecanismo concreto es en parte desconocido, varias evidencias genéticas sugieren que la PKR actúa sobrerregulando la Beclina-1, proteína clave en la formación y maduración de los autofagosomas (Orvedahl y cols., 2007). La glicoproteína de la envuelta del VEV media la entrada del virus e induce autofagia mediante la inhibición de la vía de señalización de la Akt, que regula la autofagia mediante mTOR. Por tanto, la infección por el VEV es detectada por las células a través de la vía de señalización de nutrientes, activando de este modo un proceso autofágico antiviral (Shelly y cols., 2009). En el caso de los poliovirus, la modificación por lipidación de la LC3 y la formación de membranas dobles puede ser regulada por diferentes proteínas no estructurales codificadas por el mismo virus (Taylor y Kirkegaard, 2007). Además, recientemente se ha demostrado que una proteína de los poliovirus inhibe el movimiento de vesículas relacionadas con la autofagia mediante interacción con la maquinaria del proceso (Taylor y cols., 2009). Otro mecanismo por el cual los virus inducen autofagia es mediante la inducción de la expresión de proteínas autofágicas, de hecho, se ha indicado que la proteína X transactivadora del VHB activa la autofagia aumentando la actividad de la Beclina-1 (Tang y cols., 2009) (Figura 24).

2.5.1.2 Inhibición de la maduración de vesículas autofágicas en células infectadas

Mientras que algunos virus provocan la formación de autofagosomas, otros consiguen ser más numerosos bloqueando su maduración. La proteína de matriz 2 del virus influenza A (M2) inhibe la degradación de autofagosomas evitando su fusión con lisosomas y, como resultado, se produce la formación de un autofagosoma perinuclear en las células infectadas (Gannagé y cols., 2009). De forma similar, Nef, una proteína accesoria del VIH-1, impide la maduración autofágica provocando la acumulación de la LC3 lipidada. Curiosamente, las proteínas M2 y Nef inhiben la autofagia mediante interacción con la Beclina-1 (Gannagé y cols., 2009; Kyei y cols., 2009) (Figura 24).



Figura 24. Modulación de la autofagia en células infectadas por diversos virus (Dreux y Chisari, 2010).

2.5.2 Función antiviral de la autofagia

No sólo las vías inmunológicas inducidas por virus regulan la autofagia, ya que es evidente que los autofagosomas o ciertas proteínas autofágicas pueden influir en la respuesta inmune innata y adaptativa, y por tanto, ser capaces de regular indirectamente la replicación viral. Esto sugiere que la degradación de patógenos mediada por la autofagia puede ser característica de la respuesta inmune frente a la infección (Dreux y Chisari, 2010).

2.5.2.1 La autofagia como un mecanismo intrínseco celular que inhibe la replicación viral y/o elimina a los virus de células infectadas

La primera evidencia del potencial antiviral de la autofagia fue proporcionada por Liang y cols., quienes demostraron que la sobreexpresión neuronal de la Beclina-1 por el virus Sindbis (SV) recombinante disminuía la replicación del mismo y provocaba apoptosis neuronal inducida por el virus protegiendo además a los ratones de sufrir una encefalitis. Aunque el mecanismo antiviral preciso es desconocido, es probable que los elevados niveles de Beclina-1 pudieran provocar un aumento de la degradación de componentes virales mediante autofagia en neuronas infectadas (Liang y cols., 1998).

En otros estudios, mediante el análisis ultraestructural de neuronas infectadas por el VHS-1, se observaron estructuras semejantes a los autofagosomas que contenían partículas virales. Sin embargo, en mutantes sin la proteína inhibidora de autofagia, ICP34.5, el título viral se encontraba disminuido. De acuerdo con estos resultados, la depleción de PKR, factor celular que media la autofagia inducida por VHS-1, anula estos efectos. Esta observación sugiere que la autofagia podría inhibir la infección por VHS-1 degradando los componentes del virus en el autolisosoma y que el virus es capaz de contraatacar el proceso antiviral gracias a la acción de la proteína ICP34.5 (Tallóczy y cols., 2006) (Figura 25).



Figura 25. Modulación de la autofagia por distintos virus (Kudchodkar y Levine, 2009).

Además, se ha publicado que el silenciamiento de factores autofágicos mediante ARN de interferencia concurre en una infección letal no patogénica por el VEV, asociada a una infección aumentada, demostrando en el estudio que la autofagia juega un papel antiviral crítico a nivel celular contra la infección por VEV (Shelly y cols., 2009).

2.5.2.2 La autofagia como un mecanismo de supervivencia en la infección

Como se ha mencionado anteriormente, la sobreexpresión de Beclina-1 suprime la replicación del SV y la apoptosis inducida por el mismo. A través de la unión de homólogos de la proteína antiapoptótica Bcl-2, la Beclina-1 facilita la regulación coordinada de la apoptosis y la autofagia, principalmente como un mecanismo de supervivencia celular. La deleción del dominio de la Beclina-1, que permite su unión a Bcl-2, anula los efectos antivirales, antiapoptóticos y de supervivencia de la Beclina-1 en la infección con SV, lo que sugiere un papel protector de la Beclina-1 en la autofagia viral, a través de la reducción de la apoptosis y de la replicación viral (Liang y cols., 1998; Sinha y Levine, 2008).

El parvovirus humano B19 induce degradación autofágica mitocondrial, y por tanto, inhibe la apoptosis en células infectadas (Nakashima y cols., 2006). Además, el virus de la influenza A favorece la supervivencia de las células infectadas, ya que la capacidad del virus para inducir apoptosis es mayor en células deficientes en proteínas autofágicas. De acuerdo con estas observaciones, otros experimentos demuestran que la maduración de las vesículas autofágicas, bloqueada por la proteína M2, es requerida para la supervivencia de células infectadas por el virus de la influenza A; además, la liberación de esta proteína, y del ARN de las células infectadas aumentó en células deficientes en proteínas autofágicas, como consecuencia, probablemente, del incremento en la muerte celular. Estos resultados sugieren que el equilibrio entre la apoptosis y la autofagia regulado por la proteína M2 podría modular la replicación viral y la liberación de antígenos (Gannagé y cols., 2009).

2.5.2.3 La autofagia como mecanismo de evasión viral

Los virus han desarrollado estrategias similares a la evasión de la respuesta inmune innata con el fin de contrarrestar los efectos antivirales de la autofagia. Varios herpesvirus codifican proteínas o inducen vías de señalización celulares que inhiben la autofagia. La proteína ICP34.5 del VHS-1 bloquea la inducción de la autofagia uniéndose a la Beclina-1 (Orvedahl y cols., 2007). Asimismo, bloquea la vía de señalización PKR/eIF2 α y, consecuentemente, emplea un segundo mecanismo con el

objetivo de inhibir la formación de autofagosomas inducido por la vía PKR/eIF2 α (Figura 25).

El gamma-herpesvirus 68 murino (γ HV68) y el herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) también codifican una proteína que interactúa con la Beclina-1: vBcl-2; esta última y el Bcl-2 se unen a un dominio BH3 de la Beclina-1, evadiendo la autofagia al inhibir la maduración de los autofagosomas, mediante respuestas antivirales, logrando así su persistencia en la célula (Pattingre y cols., 2005; Sinha y cols., 2008). Otro herpesvirus, el citomegalovirus humano (HCMV), es capaz de inhibir la formación de autofagosomas, sin poseer ninguna proteína conocida homóloga de ICP34.5 o vBcl-2, posiblemente a través de la estimulación de la vía de señalización de mTOR en células infectadas (Chaumorcel y cols., 2008).

2.5.3 Función proviral de la autofagia

El autofagosoma, como estructura membranosa celular, actúa como una factoría de replicación asociada a la membrana intracelular para los virus con ARN que replican y se ensamblan en el citoplasma (Figura 26). Los complejos de replicación/transcripción de nidovirus, como el virus de la arteritis equina y coronavirus, se encuentran anclados en vesículas de doble membrana, las cuales, debido a su tamaño y a sus dos capas membranosas, se asemejan a los autofagosomas (de Haan y Reggiori, 2008; Posthuma y cols., 2008). Aunque esta teoría es controvertida, las vesículas de doble membrana en células infectadas con coronavirus, como el VHM, o el que produce el síndrome respiratorio agudo severo, SARS Co-V, parecen contener la proteína LC3, marcador de autofagosomas, además de elementos virales (Prentice y cols., 2004; Snijder y cols., 2006). De forma similar, en células infectadas con rotavirus, NSP4, una proteína viral implicada en la replicación y en la formación de partículas inmaduras de doble membrana en el lumen del ER, colocaliza con la LC3 y NSP5, un marcador del lugar de replicación del ARN de rotavirus (Berkova y cols., 2006). Por tanto, estos resultados sugieren que la vía de la autofagia es importante para la replicación de los rotavirus y nidovirus, pero se debe remarcar que la formación de vesículas de doble membrana per se no implica necesariamente a la maquinaria autofágica (Dreux y Chisari, 2010).



Figura 26. Función proviral de la autofagia (Dreux y Chisari, 2010).

La infección por DENV, un virus con ARN de cadena simple que estimula la formación de autolisosomas, es modulada por la inhibición de la autofagia, sugiriendo que la maquinaria autofágica favorece la replicación del DENV. La presencia de los complejos de replicación, en vesículas autofágicas en células infectadas por el DENV, parece ser debida a que la LC3 colocaliza con la cadena doble del ARN y con una proteína viral no estructural (Lee y cols., 2008; Panyasrivanit y cols., 2009).

2.5.3.1 La autofagia participa en la biogénesis viral

Al contrario de la visión común de la autofagia como un proceso catabólico principalmente implicado en el reciclado de macromoléculas, el mecanismo autofágico puede también desempeñar un papel anabólico y participar en la biosíntesis de ciertos virus. En el caso del VIH-1, algunas proteínas virales colocalizan e interactúan con la LC3 en células infectadas y la maquinaria autofágica promueve su procesamiento. Curiosamente, existen proteínas virales que bloquean la maduración de los autofagosomas y protegen a los virus de la degradación (Kyei y cols., 2009).

Otro ejemplo de virus que emplea su maquinaria viral en beneficio propio es el virus de la diarrea viral bovina (BVDV), el cual incorpora por recombinación parte de la secuencia de la LC3 en su genoma, permitiendo la escisión específica de su

poliproteína en proteínas individuales presuntamente por la proteasa Atg4 (Meyers y cols., 1998).

2.5.3.2 La autofagia promueve la liberación viral

Las proteínas no estructurales de los virus de la familia *Picornaviridae*, como poliovirus o el enterovirus coxsackie B3 (CVB3), colocalizan con marcadores autofágicos, por lo que las proteínas autofágicas aumentan la replicación y producción viral (Jackson y cols., 2005; Wong y cols., 2008) (Figura 27). Las vesículas con LC3 inducidas durante la infección con poliovirus están fisicamente inmovilizadas; este anclaje está regulado de manera dependiente de microtúbulos por una proteína de membrana viral. La fijación de estas vesículas contribuye a la liberación del virión, una vez que el número de partículas virales infectivas dentro de la célula alcanza cierto umbral, y se produce el colapso de la red de microtúbulos (Taylor y cols., 2009; Taylor y Jackson, 2009).



Figura 27. La autofagia promueve la liberación viral (Kudchodkar y Levine, 2009).

2.5.3.3 La autofagia colabora en la traducción de ARN

Los reguladores clave en la formación de vesículas autofágicas: Beclina-1, Atg5, Atg7 y Atg12, son factores provirales de la infección productiva de algunos virus, como es el caso del VHC. Las proteínas autofágicas participan en la traducción/replicación

del virus, y una regulación negativa de éstas perjudica la replicación de los replicones del ARN del virus. Además, algunos de los factores del hospedador son componentes clave en la maquinaria autofágica: las proteínas autofágicas son requeridas para iniciar la traducción del nuevo ARN viral en células infectadas *de novo*, pero no son necesarias para mantener el proceso una vez que la replicación viral se ha establecido (Sir y cols., 2008; Dreux y cols., 2009). Un subdominio del RE ha sido recientemente propuesto como fuente para la formación de membranas de aislamiento. Mediante el remodelado de membranas del RE, las proteínas o las vesículas autofágicas podrían proporcionar un soporte inicial membranoso para la traducción del ARN viral antes de la acumulación de proteínas virales y de que se produzcan modificaciones celulares inducidas por el establecimiento eventual del VHC (Moradpour y cols., 2007).

2.6 La melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptofamina) es la principal hormona secretada por la glándula pineal, sustancia aislada por primera vez por el dermatólogo Aaron Lerner y colaboradores, quienes consiguieron aislar una pequeña cantidad de un factor activo procedente de 2500 glándulas pineales de vaca. Estos autores observaron que dicha molécula aclaraba los melanocitos en la piel de anfibios, y le dieron el nombre de melatonina al relacionar su función con el pigmento melanina y su estructura con la serotonina (Lerner y cols, 1958).

En un principio se pensó que la glándula pineal era un vestigio de un órgano más grande debido a su pequeño tamaño (5-8 mm) y a sus funciones hasta ahora desconocidas. Hoy en día, gracias a toda la historia de la investigación de la glándula pineal, se sabe que se trata de una glándula endocrina presente prácticamente en el centro del cerebro de todos los vertebrados. Los pinealocitos son el principal tipo de células del parénquima pineal humano que está rodeado por tejido conectivo; la superficie de la glándula está recubierta por una cápsula pial (Kleinschmidt-DeMasters y Prayson, 2006). Fue Axelrod en 1974 quien demostró que todos los pinealocitos poseen la maquinaria necesaria para la síntesis de melatonina (Axelrod, 1974). Histológicamente, la glándula pineal en los mamíferos está compuesta por dos tipos celulares integrados en folículos: la célula parenquimatosa o pinealocito, y la célula intersticial o astrocito inmaduro (Vollrath, 1985). La evolución filogenética funcional de la glándula pineal se corresponde con una evolución citológica, de tal forma que, si en especies inferiores predomina el pinealocito como fotorreceptor, conforme nos acercamos a los mamíferos, las estructuras celulares evolucionan para capacitar al pinealocito de la síntesis de melatonina y otras sustancias, y su posterior secreción.

Mientras que han sido descritos la mayoría de los misterios en cuanto a la fisiología y anatomía de esta glándula, en los últimos 40 años el interés por su principal producto, la melatonina, ha aumentado considerablemente.

La melatonina es un mediador ubicuo que se encuentra tanto en animales y bacterias, eucariotas unicelulares, algas, hongos y animales invertebrados (Reiter, 1995; Hardeland, 2009), como en plantas (Reiter y cols., 2001; Kolar y Machackova, 2005). En mamíferos es producida por la glándula pineal, pero también por una gran variedad de tejidos extrapineales (Conti y cols., 2000; Carrillo-Vico y cols., 2005b; Kobayashi y cols., 2005), y se ha clasificado como un importante sincronizador endógeno del ritmo circadiano, especialmente en animales de reproducción estacional (Reiter, 1980).

2.6.1 Estructura y metabolismo de la melatonina

La melatonina es una indolamina altamente soluble. La oscuridad es una condición necesaria para su producción y liberación, mostrando una ritmicidad circadiana (Jiménez-Jorge y cols., 2005).

Su síntesis se puede resumir en tres pasos principales. Comienza con la transformación del triptófano, un aminoácido aromático esencial proveniente de los vasos cerebrales, que entra en el pinealocito y sufre una hidroxilación mediante la TPH, convirtiéndose en 5-hidroxitriptófano. Posteriormente, se descarboxila mediante la L-triptófano descarboxilasa, AAD, para formar 5-hidroxitriptamina o serotonina. A continuación, se produce la subsecuente metabolización de la serotonina por la AA-NAT, cuya actividad aumenta de 30 a 70 durante la noche, presentando un marcado ritmo circadiano y obteniéndose como producto la N-acetil-5-hidroxi-triptamina o N-acetil serotonina (Klein y cols., 1997). Por último, se produce la conversión de la N-acetil serotonina en N-acetil-5-metoxitriptamina, melatonina, mediante la acción de la enzima HIOMT (Ekmekcioglu, 2006) (Figura 28).



Figura 28. Biosíntesis de la melatonina. TPH: triptófano hidroxilasa, AAD: aminoácido aromático descarboxilasa, AA-NAT: arilalquilamina N-acetil-transferasa, HIOMT: hidroxiindol O-metiltranferasa.

La actividad de la AA-NAT, determina el ritmo pineal de producción hormonal y puede regularse mediante su expresión génica o mediante la activación y estabilidad de la enzima (Hardeland, 2008). La expresión de la enzima se puede regular por una vía nerviosa controlada por el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, el llamado reloj biológico. Esta vía comienza en la retina y continúa a través de los axones de las células ganglionares (Lewy y cols., 1980).

El estímulo lumínico durante el día mantiene hiperpolarizados a los fotorreceptores, lo que impide la liberación al final de la vía nerviosa de noradrenalina. En ausencia de luz, los fotorreceptores generan potenciales de acción que son conducidos por esta vía neuronal hasta los terminales simpáticos que liberan noradrenalina, que se une a receptores adrenérgicos α 1 y β 1 del pinealocito (Reiter, 1991). Dicha unión desencadena una reacción bioquímica intracelular que se traduce en un incremento de la expresión y actividad de la AA-NAT, con la consecuente

elevación de las concentraciones de N-acetil-serotonina y melatonina (Hardeland y cols., 1993).

Es importante destacar que en vertebrados, la melatonina no sólo se forma en la glándula pineal, sino también en la glándula lacrimal (Mhatre y cols., 1988), retina (Grace y cols., 1991), cuerpo ciliado del iris (Aimoto y cols., 1985), leucocitos mononucleares (Guerrero y Reiter, 2002), tracto gastrointestinal (Bubenik, 1980), ovario (Itoh y cols., 1997), placenta (Reiter y cols., 2014), y en el sistema portal hepático (Huether y cols., 1992), lo que implica una gran cantidad de melatonina extrapineal. Debido a su presencia ubicua desde bacterias hasta plantas y animales, debemos asumir que en la dieta la melatonina representa un componente diario fundamental (Hardeland, 2012; Pandi-Perumal y cols., 2013). Las cantidades de melatonina difieren bastante entre especies; se trata de una molécula con una corta vida media en circulación (aproximadamente 10 minutos) y dado su carácter lipofílico, es capaz de cruzar fácilmente cualquier membrana alcanzando todos los fluidos, tejidos, y compartimentos celulares, por lo que es complicado cuantificar la concentración exacta de melatonina en la sangre circulante. Además, a parte de que existan fluctuaciones en los niveles de melatonina asociados con los ciclos de luzoscuridad, la síntesis de melatonina varía en función de la edad. El ritmo circadiano de la melatonina está fuertemente influido por la edad: los recién nacidos y hasta los tres meses de vida producen cantidades elevadas de melatonina en relación al adulto, pero carecen de ritmo circadiano; al final del primer año de vida es cuando comienzan a diferenciarse los niveles plasmáticos diurnos y nocturnos (Waldhauser y cols., 1993; Reiter, 1998). El ritmo circadiano se mantiene desde la pubertad hasta que en la edad adulta, entre los 45 y los 65 años, decae progresivamente hasta igualarse los niveles séricos diurnos y nocturnos (Reiter, 1995). Otros factores que afectan al ritmo circadiano de la melatonina son el ciclo menstrual, el tiempo diario de exposición al sol, el consumo de algunos fármacos, el estrés y el ejercicio (Ariznavarreta y cols., 2002).

La melatonina es metabolizada principalmente en el hígado mediante una hidroxilación, convirtiéndose en 6-hidroxi-melatonina y posteriormente en sulfato o glucorónido. Además del hígado, existen otras vías alternativas de degradación de melatonina en la retina, cerebro, plexo coroideo y en la glándula pineal. Una vez degradada, el 90% de la melatonina circulante es excretada en la orina (Vanecek, 1998).

2.6.2 Funciones de la melatonina

Cuando Lerner y colaboradores aislaron por primera vez en 1958 la melatonina, probablemente no anticiparan las futuras implicaciones de su trabajo. Unos años

después, esta hormona recibiría mucha más atención como el principal regulador de los ritmos circadianos (Redman y cols., 1983). Poco después, los investigadores observaron en estudios con animales de laboratorio que la melatonina podría afectar al cerebro y, de ese modo, a las gónadas y a otros componentes de los sistemas neuroendocrinos (Wurtman, 1985).

Unas décadas más tarde se hizo evidente que esta indolamina tenía acciones significativamente más amplias. La melatonina ha sido identificada como una molécula antioxidante que es capaz de eliminar RL (Tan y cols., 1993) con alta eficiencia para proteger a la célula contra las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (Hardeland, 2008). Además de la capacidad intrínseca para depurar RL, la melatonina es capaz de estimular la actividad y expresión de otros sistemas antioxidantes, estableciendo así una forma de acción indirecta para la reducción del estrés oxidativo (Kotler y cols., 1998; Mayo y cols., 2002). En primer lugar, estimula el ciclo del glutatión, aumentando la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) y de la glutatión reductasa (GR), regulando así la relación glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH) (Barlow-Walden y cols., 1995; Pablos y cols., 1998). Por otra parte, la melatonina aumenta la producción de glutatión por la estimulación de la γ-glutamilcisteína sintetasa (γ -GCS) (Urata y cols., 1999), y estimula la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), que es la encargada de generar la forma reducida del nicotín adenín dinucleótido fosfato (NADPH), requerido por la GR (Pierrefiche y Laborit, 1995). También inhibe otras enzimas que generan RL y además ejerce una acción sinérgica con otros antioxidantes como las vitaminas E y C (Antolín y cols., 1996; Reiter y cols., 2003).

Además de su función antioxidante, la melatonina también participa en el control de los ritmos circadianos, la regulación de la reproducción y la inmunomodulación.

La glándula pineal es el principal mediador de la respuesta fisiológica ante los ritmos anuales, así como de los ritmos circadianos. Mediante su principal producto de secreción, la melatonina, actúa como nexo de unión entre el medio ambiente luminoso y los sistemas nervioso y endocrino. Todos los efectos cronobióticos de la melatonina están mediados por los receptores de membrana MT₁ y MT₂ (Jin y cols., 2003; Dubocovich y Markowska, 2005). Se ha observado que la administración exógena de melatonina sincroniza los ritmos circadianos (Cassone y cols., 1986; Reiter, 1993), y además produce hipotermia (Deacon y Arendt, 1995), por ello se cree que la melatonina también regula la variación circadiana de la temperatura corporal (Kostervan Hoffen y cols., 1993).

Bajo fotoperiodos naturales, la duración del pico nocturno de melatonina es inversamente proporcional a las horas de luz. En animales de reproducción estacional, la melatonina regula el tamaño de los órganos sexuales, la secreción de hormonas asociadas con la fisiología reproductiva y el ciclo estral (Reiter, 1993; Moore, 1999). En particular, los cambios estacionales en los patrones de secreción de melatonina constituyen una señal esencial para las fluctuaciones anuales de la capacidad reproductora en animales mantenidos bajo condiciones fotoperiódicas naturales (Reiter, 1973; Arendt, 1986). Se ha propuesto una relación entre la disminución de la secreción de melatonina al final de la infancia y la pubertad y el desarrollo de los caracteres sexuales (Waldhauser y cols., 1993).

Los efectos inmunomoduladores de la melatonina representan otra línea de defensa (Guerrero y Reiter, 2002; Hardeland, 2008), y varios estudios han puesto de manifiesto sus funciones antiinflamatorias mediante la inhibición del NF- κ B y el subsecuente descenso de los niveles de citoquinas proinflamatorias (Reiter y cols., 2000; Carrillo-Vico y cols., 2005a; Mayo y cols., 2005; Escames y cols., 2006); o bien, se han observado los efectos positivos de su administración en ratas en modelos de enfermedades pulmonares caracterizadas por edema, inflamación y fibrosis (Taslidere y cols., 2014). La melatonina también ejerce una acción estimulante de la respuesta inmune mediante la activación de varios tipos celulares como los linfocitos T y B, NK (del inglés, *natural killer*), monocitos y células del sistema mononuclear fagocítico (Hardeland, 2008).

2.6.3 La melatonina y el hígado

En lo que respecta al hígado, un amplio número de estudios han demostrado el papel protector de la melatonina en diferentes situaciones fisiopatológicas, como en el caso del daño por la isquemia y reperfusión hepática (Kim y Lee, 2008; Ambriz-Tututi y cols., 2009; Pandi-Perumal y cols., 2013) y el daño por estrés oxidativo inducido (Mauriz y cols., 2007). También se ha demostrado que la administración de melatonina a ratas previene la fibrosis inducida por tetracloruro de carbono (Ogeturk y cols., 2008; Hong y cols., 2009), mejora la hepatitis no alcohólica inducida por una dieta deficiente en metionina y colina (Tahan y cols., 2009) e impide la hepatotoxicidad inducida por diferentes fármacos (Kurus y cols., 2009). La melatonina también protege contra el daño hepático agudo inducido por agentes químicos como tioacetamida (Túnez y cols., 2007). Aunque en muchas células tumorales la melatonina promueve la apoptosis (Rubio y cols., 2007; Martín-Renedo y cols., 2008), en las células no tumorales se comporta como un agente antiapoptótico, y se han demostrado también efectos protectores contra la apoptosis hepática inducida por el envejecimiento (Molpeceres y cols., 2007), por lesión alcohólica (Hu y cols., 2009), o por la administración de Dgalactosamina (Wang y cols., 2007).

En el modelo animal de FHF de etiología vírica inducida por la infección con el VRHD, nuestro grupo de investigación ha demostrado en trabajos previos que la
melatonina no sólo posee efectos antioxidantes, sino que inhibe la apoptosis de forma dependiente de la dosis (Tuñón y cols., 2011a), reduce la inflamación y aumenta la regeneración del hígado (Laliena y cols., 2012), mostrando así una evidencia clara de que la melatonina podría tener alguna aplicación clínica en el tratamiento de pacientes con FHF.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material

Para el presente estudio se han utilizado los siguientes medios instrumentales:

- Autoclave: Raypa, modelo Sterilmatic.
- Balanzas de precisión: Mettler Toledo, modelo AB104-S; Mettler Toledo, modelo PB1501-S.
- Baños termostáticos: Selecta, modelo 135925; Selecta, modelo CE95; Selecta, modelo Unitronic 32.
- Centrífugas: Beckman, modelo XL-10k. Rotor 70:1 Ti; Eppendorf, modelo 5451C; Sorvall, modelo RC-5B.
- Cubeta electroforesis vertical: Bio-Rad, modelo Mini-PROTEAN Tetra Cell.
- Desecador de geles: Bio-Rad, 583.
- Espectrofotómetro NanoDrop 1000, Thermo Scientific.
- Fuente de alimentación: Bio-Rad, modelo 200/2.
- Homogeneizador: Polytron.
- Lector Multi-Modal de Microplacas Synergy HT, BioTek.
- Material quirúrgico: bisturís (hoja 24), pinzas, tijeras, agujas, jeringuillas, cánulas, guantes estériles, etc.
- Material de laboratorio de carácter general: pipetas y micropipetas automáticas, agitadores de tubo, gradillas, frigoríficos, arcones congeladores de -80°C, ordenadores, etc.
- Microscopios ópticos: Nikon OPTIPHOT-2[®]; Nikon Eclipse E 400[®]; Nikon Provise AX 70[®].
- Microscopio electrónico de transmisión: JEOL LTD.
- Microscopio de fluorescencia: Nikon Eclipse Ti[®].
- Microtomo de rotación: Leitz 1512.
- pHmetros: Mettler Toledo, modelo SevenMultiTM.
- Sistema de transferencia de proteínas: Bio-Rad, modelo Trans-Blot[®] Turbo[™].
- Termociclador: Applied Biosystems, modelo ABI 7000 Sequence Detection System.
- Ultramicrotomo automático: Reichert Ultracut E.

3.2 Soluciones

Las principales soluciones y productos utilizados en la realización de este estudio, y que no se describen con detalle en los apartados correspondientes, han sido los siguientes:

- Solución salina fisiológica (SSF): NaCl 154 mM.
- Pentobarbital sódico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.): se disuelve en SSF hasta una concentración final de 5 mg/ml.
- Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 0,14 M; KH₂PO₄ 1,4 mM; NaHPO₄ 8 mM; KCl 2,7 mM.
- Solución de Alsever (Sigma-Aldrich): NaCl (4,2 g/l), citrato de sodio (8 g/l), ácido cítrico (0,55 g/l), D-glucosa (20,5 g/l).

3.3 Animales

Se emplearon conejos machos de raza Nueva Zelanda Blanca de 9 a 10 semanas de edad con un peso comprendido entre los 2 y los 2,5 kg. Los animales se mantuvieron en el animalario de la Universidad de León, en jaulas individualizadas con comida y agua *ad libitum*, en una sala P2 climatizada a 21-22°C y un 50% de humedad con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Durante una semana se les mantuvo en periodo de aclimatación.

Los experimentos fueron realizados de acuerdo con la Declaración de Helsinki (2000) de la Asociación Médica Mundial, y las regulaciones españolas del uso de animales de laboratorio (RD 1201/2005), y fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de León. Se procuró en todo momento minimizar el sufrimiento animal y reducir en lo posible el número de animales utilizados.

3.4 Diseño experimental

3.4.1 Obtención del inóculo vírico

El inóculo vírico utilizado para la infección experimental se preparó a partir de hígados de animales recién muertos, previamente inoculados con el virus de la RHD (cepa AST/89). Los hígados se homogeneizaron al 10% en PBS a pH 7,2 y se sometieron a dos centrifugaciones sucesivas (500 g durante 20 minutos y 6000 g durante 30 minutos). El sobrenadante se filtró a través de un tamaño de poro de 0,2 μ m y se conservó en alícuotas a -80°C.

3.4.2 Titulación del virus

Para titular el virus se empleó la técnica de hemoaglutinación. Se dispensaron 50 µl de SSF en todos los pocillos y 50 µl del sobrenadante filtrado del homogeneizado de tejido hepático en el primer pocillo. Posteriormente se hicieron diluciones dobles seriadas en placas de microtitulación de fondo en "V" y se añadieron 50 µl de una disolución de glóbulos rojos humanos del tipo O, que fueron recogidos frescos en solución de Alsever y se mantuvieron durante 8-10 horas. A continuación se centrifugaron y lavaron con PBS. Tras una nueva centrifugación, los glóbulos rojos se resuspendieron en PBS (0,5%). Las placas se sellaron con una película plástica adhesiva y se incubaron toda la noche a 4°C. La dilución más alta en la que se observó hemoaglutinación completa contiene una unidad hemoaglutinante en el volumen del inóculo vírico depositado (Figura 29).



Figura 29. Titulación del VRHD por la técnica de hemoaglutinación.

3.4.3 Inoculación de los animales y grupos experimentales

En estudios previos nuestro grupo de investigación puso de manifiesto que durante la infección experimental con el VRHD los datos bioquímicos y la expresión de los genes implicados en las diferentes vías moleculares de daño, apoptosis y regeneración cambiaban significativamente entre las 36 y 48 hpi (Tuñón y cols., 2003; García-Lastra y cols., 2010; Tuñón y cols., 2011a,b). Sin embargo, el mecanismo infectivo y de replicación viral del VRHD no había sido estudiado a fondo desde los primeros periodos infectivos. Por ello, en un primer protocolo experimental, se comprobaron los efectos de la infección mediante el VRHD a lo largo del tiempo sobre la replicación viral siguiendo la evolución a través de la recogida de muestras a

diferentes tiempos postinfección y su relación con el proceso de autofagia; además, se dilucidó el efecto del VRHD sobre los distintos mecanismos moleculares en los que participan los componentes de la maquinaria autofágica, y las relaciones existentes entre estos y las vías de señalización de la apoptosis y del estrés del RE. Para ello, se emplearon 36 conejos: 30 fueron inoculados por vía intramuscular con 2x10⁴ unidades hemoaglutinantes de la cepa AST/89 del VRHD en un volumen total de 300 µl de SSF a las 21 horas. Como controles no infectados se utilizaron 6 animales, que recibieron 300 µl de SSF. Los 30 animales infectados con el VRHD se dividieron en cinco grupos experimentales a los que se sacrificó a las 12, 18, 24, 30 y 36 hpi (n=6). Los grupos experimentales utilizados en el primer protocolo experimental se resumen a continuación:

- Grupo de conejos control: Control
- Grupo de conejos infectados, sacrificados a las 12 hpi: VRHD12
- Grupo de conejos infectados, sacrificados a las 18 hpi: VRHD18
- Grupo de conejos infectados, sacrificados a las 24 hpi: VRHD24
- Grupo de conejos infectados, sacrificados a las 30 hpi: VRHD30
- Grupo de conejos infectados, sacrificados a las 36 hpi: VRHD36

Una vez confirmado que la infección con el VRHD induce una rápida respuesta autofágica en los animales infectados, observándose valores significativamente aumentados de los marcadores autofágicos más representativos, decidimos investigar si el efecto protector de la melatonina contra el daño hepático inducido por el VRHD puede estar asociado a una modulación de la respuesta autofágica estudiando la evolución de la enfermedad a diferentes tiempos con tratamiento y sin él. Para este segundo protocolo experimental se emplearon 36 conejos. De los 36 conejos utilizados, 32 fueron inoculados por vía intramuscular con 2x10⁴ unidades hemoaglutinantes de la cepa AST/89 del virus de la RHD en un volumen total de 300 µl de SSF a las 21 horas. Como controles no infectados se utilizaron 4 animales, que recibieron invecciones del vehículo. De los 32 animales infectados con el VRHD, 16 recibieron 20 mg/kg de melatonina (Sigma-Aldrich) a las 0, 12 y 24 hpi. La melatonina se diluyó en etanol absoluto y se hicieron posteriores diluciones en SSF hasta alcanzar una concentración de etanol del 5%, que fue la que se administró a los conejos a través de una inyección intraperitoneal. Los conejos fueron sacrificados a las 18, 24, 30 y 36 hpi (n=4). Los grupos experimentales utilizados en el segundo protocolo experimental se resumen a continuación:

- Grupo de conejos control: Control
- Grupo de conejos infectados, sacrificados a las 18 hpi: VRHD18
- Grupo de conejos infectados, tratados con melatonina y sacrificados a las 18 hpi: VRHD18+Mel
- Grupo de conejos infectados, sacrificados a las 24 hpi: VRHD24
- Grupo de conejos infectados, tratados con melatonina y sacrificados a las 24 hpi: VRHD24+Mel
- Grupo de conejos infectados, sacrificados a las 30 hpi: VRHD30
- Grupo de conejos infectados, tratados con melatonina y sacrificados a las 30 hpi: VRHD30+Mel
- Grupo de conejos infectados, sacrificados a las 36 hpi: VRHD36
- Grupo de conejos infectados, tratados con melatonina y sacrificados a las 36 hpi: VRHD36+Mel

Los resultados del estudio pusieron de manifiesto que la melatonina posee la capacidad de reducir la autofagia asociada a la infección con el VRHD y de inhibir la replicación del ARN viral desde los primeros periodos postinfección. Por tanto, con el fin de ahondar más en el papel de la melatonina frente a la infección viral, decidimos inducir la respuesta de estrés del RE mediante la infección viral y conocer los efectos del virus a las 36 hpi, puesto que es el periodo postinfectivo en el que el virus se encuentra totalmente extendido por los hepatocitos y el periodo durante el cual se producen los cambios más significativos en la expresión de los genes implicados en el daño y regeneración hepática (García-Lastra y cols., 2010; Laliena y cols., 2012). Por consiguiente, decidimos estudiar en primer lugar los mecanismos moleculares implicados en la vía de señalización del estrés del RE a través de la UPR. Una vez elucidados, investigamos los posibles efectos protectores de la melatonina administrada a los conejos y estudiamos si estos eran dependientes de la dosis. Para este tercer protocolo experimental se utilizaron 30 conejos machos: 18 fueron inoculados por vía intramuscular con 2x10⁴ unidades hemoaglutinantes de la cepa AST/89 del VRHD en un volumen total de 300 µl de SSF a las 21 horas. Como controles no infectados se utilizaron 12 animales, 6 de ellos recibieron inyecciones de 4 ml de vehículo (etanol al 5%) a las 0, 12 y 24 hpi (Control), y otros 6 recibieron una dosis de melatonina (Sigma-Aldrich) de 20 mg/kg intraperitoneal a las mismas horas (Control+Mel). Los 18 animales infectados con el VRHD se incluyeron en tres grupos experimentales: un grupo de 6 animales que recibieron vehículo (VRHD), otro grupo de 6 animales que recibieron melatonina a una dosis de 10 mg/kg (VRHD+Mel10) y otros 6 animales que recibieron 20 mg/kg de melatonina (VRHD+Mel20), a las 0, 12 y 24 hpi. Los grupos experimentales utilizados en el tercer protocolo experimental se resumen a continuación:

- Grupo de conejos control: Control
- Grupo de conejos control que recibieron una dosis de melatonina de 20 mg/kg de peso: Control+Mel
- Grupo de conejos infectados: VRHD
- Grupo de conejos infectados, tratados con melatonina a dosis de 10 mg/kg de peso: VRHD+Mel10
- Grupo de conejos infectados, tratados con melatonina a dosis de 20 mg/kg de peso: VRHD+Mel20

3.4.4 Recogida de muestras

Los animales fueron sacrificados a las diferentes horas señaladas para cada uno de los tres protocolos experimentales con una inyección intravenosa de pentobarbital sódico e inmediatamente se realizó la necropsia. El hígado se pesó, se troceó y se lavó en SSF fría, posteriormente se congeló por inmersión en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C para las determinaciones moleculares.

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Determinaciones en hígado

3.5.1.1 Obtención de homogeneizado total

Se homogeneizaron 25 mg de tejido hepático en 1 ml de tampón RIPA y una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

Los homogeneizados obtenidos se pasaron a tubos eppendorf y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Por último, se centrifugaron las muestras a 13000 g durante 30 minutos a una temperatura de 4°C. Se realizaron alícuotas del sobrenadante en tubos eppendorf que se almacenaron hasta su uso a -80°C.

3.5.1.2 Obtención de las fracción nuclear

La extracción nuclear se lleva a cabo mediante lisis celular y posteriores centrifugaciones.

Reactivos:

- Reactivo A: HEPES-KOH 0,01 M pH 7,9, glicerol 250 g/l, NaCl 0,420 M, MgCl₂ 0,0015 M, 2 x 10⁻⁴ M EDTA, DTT 5 x 10⁻⁴ M, 2 x 10⁻⁴ M PMSF.
- Reactivo B: NaCl HEPES-KOH 0,02 M pH 7,9, glicerol 250 g/l, NaCl 0,042 M, PMSF 15 x 10⁻⁴ M.

Para la obtención de los extractos nucleares se homogeneizaron 100 mg de tejido hepático en 5 x 10^{-4} l del reactivo A y una mezcla de inhibidores de fosfatasas (Roche Diagnostics GmbH) utilizando *potters* y vástagos autoclavados con el fin de disgregar la matriz extracelular y las membranas celulares. Tras 15-60 minutos de incubación en hielo, los homogeneizados obtenidos fueron centrifugados a 1000 g durante 10 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en 2,5 x 10^{-4} l del reactivo B, se homogeneizó y se incubó a 4°C durante 30 minutos. Los restos celulares se eliminaron mediante una centrifugación a 14000 g durante 15 minutos a 4°C y, posteriormente, se recogió la fracción del supernadante con las proteínas de unión al ADN de cada muestra y se almacenaron en alícuotas a -80°C hasta su análisis.

3.5.1.3 Concentración de proteína

Se utilizó la técnica descrita por Bradford (Bradford, 1976). El método Bradford se basa en la unión cuantitativa de un tinte, Coommassie Brilliant Blue, a una proteína desconocida y en comparar esta unión a diferentes cantidades de proteína estándar, albumina sérica bovina (ASB). El *Coomassie Brilliant Blue* es un pigmento de tipo trifenilmetano amónico, que se une de forma no covalente a los restos de lisina de las proteínas.

Reactivos:

- Solución de ASB patrón (0,5 mg/ml) (Sigma-Aldrich).
- H₂O milliQ
- Coomassie Brilliant Blue solution Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.).

Se preparó la curva patrón y las muestras problema por triplicado en una placa de 96 pocillos. La mezcla de reacción se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad y se leyó la absorbancia a 595 nm. La concentración se expresa en mg de proteína/ml en el lector de microplacas Synergy HT (BioTek Intruments, Winooski, VT, EE.UU.).

3.5.1.4 Concentración de glutatión reducido (GSH)

Fundamento:

Se siguió el procedimiento descrito por Hissin y Hilf (1976), basado en la reacción específica del GSH con el *o*-ftalaldehído (OPT) a pH 8,0 formándose un producto altamente fluorescente que se activa a 350 nm con un máximo de emisión a 420 nm. Para ello, se utilizaron los sobrenadantes de homogeneizados hepáticos preparados con 250 mg de tejido en tampón fosfato sódico 0,1 M/EDTA 5 mM pH 8,0, y H₃PO₄ al 25% en una proporción 1:20 y centrifugados a 100000 g durante 30 minutos a 4°C.

Método:

Se diluyeron 0,5 ml de los sobrenadantes obtenidos tras la centrifugación de los homogeneizados en 4,5 ml del tampón fosfato/EDTA pH 8,0. La siguiente mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos:

- 1,8 ml de tampón fosfato/EDTA pH 8,0
- 100 µl de homogeneizado diluido
- 100 μl de OPT (7,5 μM)

Se midió la fluorescencia en un espectrofluorímetro a 350 nm de excitación y 420 nm de emisión. Como blanco reactivo se utilizó la mezcla de incubación sustituyendo los 100 μ l de muestra diluida por tampón fosfato/EDTA.

Para el cálculo de las concentraciones se realizó una recta patrón con soluciones crecientes de GSH de 0,81 a 32,54 nM.

3.5.1.5 Concentración de glutatión oxidado (GSSG)

Fundamento:

Se determinó según el método de Hissin y Hilf (1976), con algunas modificaciones. Dicho método se basa en la reacción del GSSG con el fluoróforo OPT a pH 12; a este elevado pH del medio, la conversión de GSH a GSSG es prácticamente nula. El uso de N-etilmaleimida (NEM) se debe a que es un compuesto orgánico que actúa como un potente inhibidor de la GR; como consecuencia, los métodos basados en reducciones enzimáticas de GSSG son dependientes de la eliminación total de NEM de la muestra en incubación. Para la realización de la técnica, se utilizaron los mismos sobrenadantes de homogeneizados hepáticos descritos en el apartado anterior.

Método:

Se incubaron 0,5 ml de los sobrenadantes obtenidos tras la centrifugación de los homogeneizados hepáticos junto con 200 μ l de NEM 0,04 M a temperatura ambiente durante 30 minutos para que NEM interaccione con el GSH presente en el tejido. Posteriormente, se añadieron 4,3 ml de NaOH 0,1 N.

Se midió la fluorescencia en un espectrofluorímetro a 350 nm de excitación y 420 nm de emisión. En el blanco reactivo se sustituyeron los 0,1 ml de la mezcla con la muestra por NaOH (0,1 N). Para el cálculo de las concentraciones se realizó una recta patrón con soluciones crecientes de GSSG de 0,33 a 1,63 mM.

3.5.1.6 Western blot

La determinación de las proteínas se llevó a cabo mediante la técnica de Western blot utilizando el sistema de Laemmli (Laemmli, 1970). Los reactivos empleados fueron los siguientes:

- Solución de ebullición: H₂O; Tris/HCl 2 M; glicerol 60%; SDS 10%; pirrolina 0,5%.
- Tampón de electroforesis: Tris 25 mM; glicina 0,2 M; SDS 3,5 mM; pH 8,8.
- Tampón de transferencia: Tris 25 mM; glicina 0,2 M y metanol 20%.
- PBS: NaCl 0,14 M; KH₂PO₄ 8 mM; KCl 2,7 mM.
- PBS-Tween 0,05%
- Solución de bloqueo y de incubación de anticuerpos: 1-5% de leche en polvo desnatada en PBS-Tween.

1. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se tomaron entre 30-50 µg de proteína a la que se le añadió solución de ebullición y se incubó 2 minutos a 100°C. A continuación se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida, acrilamida/bisacrilamida (Sigma-Aldrich) en tampón de electroforesis.

Para la realización de los distintos geles de separación (7, 9, 12 y 15%) se prepararon las siguientes mezclas:

Dos geles	7%	9%	12%	15%
Acrilamida/Bisacrilamida (ml)	2,45	3,15	4,20	6,25
Tris/HCl pH 8,8 1,5 M (ml)		3,5		3
SDS 10% (µl)	140			125
PSA 10% (μl)	100			62,5
TEMED 1% (μl)	7			6,25
Agua (ml)	7,85	7,15	6,10	2,90

Tabla 1. Composición de los diferentes geles de separación.

Una vez se llenaron los cristales, se añadieron cuidadosamente isobutanol para evitar la formación de burbujas. Tras polimerizar el gel, se eliminó el isobutanol, lavó con agua, secó con papel Whatman y se preparó el gel de concentración:

Dos geles	
Acrilamida/Bisacrilamida (ml)	1
Tris/HCl pH 6,8 0,5 M (ml)	2,5
SDS 10% (μl)	100
PSA 10% (μl)	200
TEMED 1% (μl)	10
Agua (ml)	6,3

Tabla 2. Composición del gel de concentración.

Una vez preparada la mezcla de todos los componentes, se distribuyó entre los cristales y se introdujo el peine, con cuidado, evitando la formación de burbujas. Ya polimerizado, se retiró el peine y se cargaron las muestras añadiendo 10 μ l de solución de ebullición.

2. Transferencia

Las proteínas ya separadas se transfirieron a unas membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno, Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) para permitir su exposición a los anticuerpos. Para realizar la transferencia se utilizó un sistema semiseco a 13 V

durante 7 minutos (Trans-Blot[®] Turbo[™]; Bio-Rad). Después se bloquearon las membranas en solución de bloqueo durante 30 minutos a 37°C.

3. Incubación con el anticuerpo primario.

Las membranas se incubaron toda la noche con cada uno de los siguientes anticuerpos específicos: Bcl-2, Bcl-xL, poli-ADP-ribosa-polimerasa (PARP)-1, p62/SQSTM1, CHOP, ATF6, PERK, p-PERK, XBP1s (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU,); JNK, p-JNK (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU.); BiP, p-IRE1, caspasa 12, LC3I/II, mTOR, p-mTOR (Abcam, Cambridge, Reino Unido) con diluciones entre 1:200 y 1:2000. Con el fin de demostrar que todas las muestras contenían la misma cantidad de proteína se emplearon los anticuerpos policionales de conejo anti- β -actina, anti-GAPDH (1:2000; Sigma-Aldrich) y anti-Lámina- β (1:200; Santa Cruz Biotechnology).

Transcurrido este periodo, se lavaron las membranas tres veces durante 10 minutos en PBS-Tween. Posteriormente, se incubaron 1 hora con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) anti conejo o ratón (de acuerdo con el anticuerpo primario utilizado) en una dilución 1:5000 (Dako, Glostrup, Dinamarca). Finalmente, se volvieron a lavar 3 veces en PBS-Tween.

4. Revelado

La detección de la proteína se realizó incubando la membrana con una mezcla comercial de HRP y quimioluminiscencia (Luminol Reagent, Santa Cruz Biotechnology) durante 1 minuto. Posteriormente, se introdujeron en un *cassette* junto con una película fotográfica (Amersham Hyperfilm ECL, Amersham, Little Chalfont, Reino Unido) durante aproximadamente 5 minutos. Tras el revelado y secado de la película se llevó a cabo la cuantificación de las bandas por densitometría utilizando un software comercial (Scion Image J Software 1.46a, Bethesda, MD, EE.UU.).

3.5.1.7 Microscopía electrónica de transmisión

Para el análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) las muestras de tejido hepático fueron seccionadas en piezas de 1 mm³ para optimizar la penetración del fijador. En este caso las secciones de hígado fueron sumergidas en una variante del fijador Karnovsky [2% glutaraldehído + 4% formalina tamponada (0,1 mol/l tampón fosfato)] durante toda la noche y posteriormente en tetróxido de osmio al 2% durante 2 horas a 4°C. Posteriormente las muestras fueron deshidratadas

sumergiéndolas en diferentes soluciones de alcohol de concentración creciente. El bloque de tejido fue infiltrado y embebido en una resina epon a 60°C durante 72 horas. Las secciones ultrafinas (70 nm) se obtuvieron en un ultramicrotomo automático (Reichert Ultracut E, Viena, Austria) usando una cuchilla de diamante y se recopilaron en una rejilla de cobre preparada con membrana de soporte. Con el fin de conferir contraste a los cortes obtenidos, se emplearon soluciones de sales de metales pesados (acetato de uranilo y citrato de plomo), las cuales contienen iones de alto número atómico, capaces de desviar el haz de electrones incidente sobre la muestra y con cierta afinidad por componentes específicos de la misma. La observación de las secciones hepáticas se realizó con un microscopio electrónico de transmisión (JEOL LTD, Tokio, Japón) a un voltaje de aceleración de 80 kV.

3.5.1.8 Extracción, purificación y cuantificación del ARN

Para la extracción de ARN total se utilizó el reactivo Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.), solución monofásica formada por una mezcla de fenol e isotiocianato de guanidina. Este reactivo es capaz de provocar la ruptura celular y disolver todos los componentes celulares a la vez que mantiene la integridad del ARN.

Reactivos:

- Trizol[®]LS
- Cloroformo (Sigma-Aldrich)
- Alcohol isopropílico (Sigma-Aldrich)
- Etanol al 75% en agua con DEPC (dietilpirocarbonato).
- Agua libre de ARNasas (Ambion, Paisley, Reino Unido).

La extracción de ARN se llevó a cabo en diferentes pasos:

El tejido se homogeneizó añadiendo 750 μ l de Trizol por cada 100 mg de tejido hepático. A continuación se incubó durante 5 minutos a 15-30°C para la completa disociación de los complejos de nucleoproteína. Seguidamente, se añadieron 200 μ l de cloroformo y se agitó vigorosamente durante unos 15 segundos, dejándose incubar nuevamente durante 5 minutos a 25°C.

El homogeneizado obtenido se centrifugó a 4°C durante 15 minutos a 12000 g, obteniéndose así tres fases: una fase inferior orgánica de color rosa que contiene proteínas, ADN y fenol; una fase intermedia con fenol y cloroformo; y una fase superior acuosa incolora en la que se encuentra el ARN en suspensión. A la fase acuosa obtenida se le añadió 0,5 ml de alcohol isopropílico y se mezcló por inversión. A continuación se incubó durante 10 minutos a 25°C y se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 12000 g.

El ARN precipitado en forma de pellet se lavó con 1 ml de etanol al 75%. Para ello se agitó en vórtex y se centrifugó nuevamente a 4°C durante 5 minutos a 7500 g.

El pellet de ARN se dejó secar durante 30 minutos, dejando así que se evaporasen los restos de trizol, cloroformo, isopropanol y etanol. A continuación, al ARN se resuspendió en agua libre de ARNasas. Finalmente, se incubó a 55°C durante 10 minutos y se almacenó a -80°C.

La pureza del ARN se estimó espectrofotométricamente mediante las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda, aplicando la siguiente fórmula:

Pureza= A260/280

Para la cuantificación del ARN total se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.).

3.5.1.9 Tratamiento del ARN con ADN-asas

Se utilizó el kit comercial *RQ1 RNase-free DNase* (Promega, Madison, WI, EE.UU.) con el fin de degradar las cadenas de ADN simples y dobles, en presencia de Mg²⁺, y así poder disponer de oligonucleótidos con extremos 3'-OH libres.

Los reactivos utilizados fueron:

- Tampón RQ1 ADNasa 10x: Tris HCl 400 mM, pH 8; MgSO₄ 100 mM; CaCl₂ 10 mM.
- ADNasa libre de ARNasa RQ1.
- ADNasa RQ1 Stop Solution 20 mM ácido etilén glicol tetraacético (EGTA), pH 8.
- El tratamiento de ADNasas se llevó a cabo al mezclar los siguientes volúmenes:
 - 2 μg de ARN
 - Enzima ADNasa libre de ARNasa (1 U/μg ARN).
 - Tampón RQ1 ADNasa 10x.

La mezcla de reacción se completó con agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 50 μ l. A continuación, se incubó a 37°C durante 30 minutos, tras los cuales se añadió 1 μ l de ADNasa RQ1 *Stop Solution* para parar la reacción.

Seguidamente, se incubó de nuevo a 65°C durante 10 minutos para activar así las ADNasas.

3.5.1.10 Reacción de la transcriptasa reversa

Se utilizó el sistema *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), basado en la capacidad de la transcriptasa reversa para sintetizar una cadena complementaria de ADN (ADNc) a partir de una secuencia molde de ARN. Para ello, se utilizaron cantidades idénticas de ARN total de cada uno de los animales de los diferentes grupos experimentales, realizándose en paralelo un control negativo.

Reactivos:

- Tampón RT-PCR 10x: Tris HCl 100 mM; KCl 500 mM; MgCl₂ 15 mM; pH 8,3.
- Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) 25x
- Iniciadores (mezcla de nucleósidos) 10x
- Transcriptasa reversa MultiScribe (50 U/ml)
- Inhibidor de ARNasas (1 U/ml)
- Agua tratada con DEPC

Con el fin de desnaturalizar las posibles estructuras secundarias del ARN y facilitar el anillamiento de los iniciadores, se incubaron 10 μ g de ARN a 25°C durante 10 minutos seguido de una posterior incubación a 37°C durante 2 horas. A continuación, se añadieron los siguientes reactivos:

- 10 µl de tampón RT-PCR
- 4 µl de mezcla de dNTP
- 10 µl de iniciadores
- 2 µl de la enzima transcriptasa reversa MultiScribe
- 1 µl de inhibidor de ARNasas

La mezcla de reacción se completó con agua tratada con DEPC hasta un volumen final de 50 μ l, manteniéndose a temperatura ambiente durante 10 minutos e incubándose posteriormente a 37°C durante 2 horas.

El ADNc obtenido se congeló a -20°C hasta el momento de su utilización.

3.5.1.11 Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real (RT-PCR)

La PCR se realizó según el procedimiento descrito por Mullis y Faloona (Mullis y Faloona, 1987) y por Saiki y cols. (Saiki y cols., 1989), basado en el proceso natural de replicación del ADN con amplificación cíclica. Partiendo de una molécula de ADN diana es posible amplificar una secuencia específica contenida en ella mediante la utilización de oligonucleótidos iniciadores diseñados a tal efecto (Figura 30).

El método consta de tres etapas: desnaturalización, anillamiento y elongación, efectuados de forma sucesiva en unas condiciones controladas de temperatura y de tiempo (Figura 30).



Figura 30. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa.

En el presente estudio, se realizó la metodología de la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR) para la estimación de la concentración de ARNm mediante el uso de *SYBR Green Master* (Rox) 2x (Roche Diagnostics GmbH) y los iniciadores correspondientes (Tabla 3). Como gen *housekeeping*, para normalizar los resultados, se utilizó el gen β -actina.

En una placa de 96 pocillos se preparó la siguiente mezcla de reacción con un volumen final de 20 μ l:

- 0,4 µl de iniciadores 15 µM (sentido y antisentido)
- 0,4 µl de ADNc
- 10 µl de FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) 2x
- 7,2 µl de agua libre de nucleasas (Ambion)

Gen	Sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')
Beclina-1	CATGCAATGGTGGCTTTCC	TCTCGCCCTTTTCAACCTCTT
UVRAG	GCGGCGTCTTCGACATCT	GATGGCCGTTTCTATTAACAATGTT
Atg5	CGTCCTGTGGCTGCAGATG	AAGGACACACTTCTTTGAGGAGATC
Atg12	TGCTGAAGGCTGTGGGAGAT	TGTTCGCTCTACAGCCCATTT
Atg16L1	CCACCAAACCGGCATGAG	CTTGCAGCTGGCTGTCATTC
p62/SQSTM1	AACAGAGGTGACCACCCTTCA	AGCACAGACTGGCTGGAAGTC
VRHD	TAGCCCAACAGAAGCACAAG	AAACAAGTCGTCAACCTCCC
BiP	ATTGACAATGGTGTCTTCGAAGTC	CCCCGCCCAGGTGAGT
СНОР	ATACATCACCACACCTGAAAGCA	GCACTCGGCTGCCATCTC
GRP94	TGCTTAATTGGATGAAAGACAAA	GCTGAGACACCACAGCCTTTT
PERK	AGAGGATCCGTCTTCCCAACA	TTGGCGAGGGCCTTCA
ATF4	GGGCGAGAAGCTGGAGAAG	GTGGCGGCCGTCTTGTT
ATF6	TGGGTGAGCCGGTTAGTATTA	GGAGTCCCGGGCTAAAGG
IRE1	TGCGAGAATCAGACGAGCAT	GGTCCCTCTCCGTGCAGAA
XBP1	CCGCCCGAGATCGAAAG	CCAAATCCACGACTTGCTGTT
XBP1s	CCCAGAAGAACCCAGTTCCTT	TGATGACGTCCCCACTGACA
TRAF2	GCGAGTGTGTCTGGGAATGA	GGCCTCTGGTGCTCTCCAA
β-Actin	TGGCATCCTGACGCTCAA	TCGTCCCAGTTGGTCACGAT

Tabla 3. Secuencias específicas de los iniciadores utilizados para la RT-PCR por Syber Green.

Las condiciones del termociclador fueron las siguientes:

- Etapa inicial de desnaturalización de 10 minutos a 95°C.
- Etapa de desnaturalización de 15 segundos a 95°C.
- Etapa de anillamiento/elongación de 1 minuto a 60°C.

Las etapas 2 y 3 se repitieron a lo largo de 50 ciclos. Cada experimento incluyó un control negativo de cada una de las muestras de ARN que no fueron sometidas a la transcripción reversa. Dicha muestra no dio lugar a producto de PCR alguno, confirmándose la ausencia de ADN genómico extraño o producto de PCR que pudiera haber contaminado la muestra previamente. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador ABI 7000 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Los cambios relativos en la expresión génica se determinaron mediante el cálculo del 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}.

3.5.1.12 Estudio inmunohistoquímico

Las muestras fueron fijadas en un buffer de formalina al 10% y embebidas en parafina. Para el estudio inmunohistoquímico se obtuvieron secciones de 4 µm, posteriormente se desparafinaron e hidrataron mediante un gradiente de etanol. Las muestras se introdujeron en una olla a presión con solución de citrato 25 mM pH 6,0 durante 10 minutos, a continuación fueron transferidas a un recipiente con agua desionizada hirviendo y se dejaron enfriar durante 20 minutos. Las secciones de tejido hepático fueron tratadas con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos a 37°C siguiendo el método de la peroxidada-antiperoxidasa (Sternberger y cols., 1970) con el fin de inactivar la actividad peroxidasa endógena. Las secciones se incubaron durante toda la noche a 4°C con anticuerpos específicos frente a CHOP (Santa Cruz Biotechnology), VP60 (Ingenasa, Madrid, España) y LC3 (Abcam). A continuación las secciones se incubaron durante 30 minutos usando el sistema EnVision+ y reveladas con una solución de 3-3-diaminobencidina (DAB) (Vector Lab, Burlingame, CA, EE.UU.). En la primera fase de la reacción la peroxidada y el peróxido de hidrógeno forman un complejo que interacciona con la DAB, quedando esta última en estado oxidado. Las moléculas de DAB, una vez oxidadas, presentan unos RL que reaccionan entre sí para formar polímeros insolubles de color marrón oscuro resistentes a los solventes de los lípidos, permitiendo obtener preparaciones histológicas permanentes. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina durante 10 segundos y montadas. La especificidad de la técnica fue evaluada mediante controles séricos negativos en los que se omitió el suero inmune primario sustituyéndose por suero preinmune.

3.5.1.13 Doble inmunofluorescencia

La unión de los anticuerpos a los antígenos es una reacción altamente específica; aprovechando esta propiedad, en 1941 Coons y cols. la emplearon como método de tinción inmunohistoquímica. Lo que debían encontrar era una sustancia coloreada que se podía visualizar unida al anticuerpo después de haber efectuado la reacción antígeno-anticuerpo. La sustancia que emplearon fue la fluoresceína, la cual pertenece al grupo de sustancias fluorescentes (Coons y cols., 1941). Para la tinción de la doble inmunofluorescencia se realizaron cortes seriados de las secciones hepáticas y posteriormente fueron desparafinadas en xileno y rehidratadas en un gradiente de etanol y finalmente en agua destilada sin permitir que las secciones se secaran durante todo el proceso. El desenmascaramiento del antígeno se realizó en una olla con EDTA 1 mM pH 8,0. Las secciones fueron llevadas a ebullición y luego se mantuvieron a una temperatura por debajo de ebullición durante 15 minutos. Las siguientes incubaciones con inmunoquímicos fueron realizadas en una cámara humidificada.

Después del desenmascaramiento y de bloquear las uniones inespecíficas, las secciones fueron coincubadas durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos específicos frente a CHOP (Abcam) y cleaved caspasa 3 (Cell Signaling Technology) a una dilución de 1:100 y 1:300, respectivamente; y frente a LAMP-1 (Santa Cruz Biotechnology) y LC3 (Abcam) a una dilución de 1:50 y 1:200, respectivamente. Después de la incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron dos lavados de las muestras con PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, en la doble inmunofluorescencia para CHOP y cleaved caspasa 3, las secciones se incubaron durante 2 horas a 21°C con los anticuerpos secundarios burro anti-conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y burro anti-ratón conjugado con Texas Red. En el caso de la doble inmunofluorescencia para LAMP-1 y LC3, las muestras se incubaron del mismo modo anteriormente descrito con los anticuerpos secundarios burro anti-conejo conjugado con FITC y burro anti-ratón conjugado con DylightTM539 (Jackson ImmunoResearch, Baltimore, PA, EE.UU.). Después de lavar las muestras con Tris-Buffer Salino (TBS), se empleó el medio Cytomation Fluorescent Mounting (Dako) para su montaje y posterior observación al microscopio de fluorescencia. En las secciones de cada grupo experimental el anticuerpo primario fue reemplazado por un diluyente del anticuerpo para asegurar uniones inespecíficas del anticuerpo secundario.

Las preparaciones fueron analizadas con un microscopio invertido de fluorescencia (Nikon Eclipse Ti, Nikon, Chiyoda, Tokio, Japón).

3.5.1.14 Actividad de la caspasa 3

Para su cuantificación se empleó una técnica fluorogénica. Se utilizó un sustrato compuesto por una secuencia peptídica reconocida por la caspasa 3 (Asp-Glu-Val-Asp, DEVD); dicho péptido está conjugado con un compuesto fluorescente basado en la cumarina denominado 7-amino-4-metilcumarina, AMC. El conjugado Ac (N-acetil)-DEVD-AMC no tiene capacidad fluorescente, pero cuando es roto por acción de la caspasa 3 activa, el producto resultante emite fluorescencia que puede ser cuantificada.

Se realizó el homogeneizado de las muestras de tejido hepático en un tampón de sacarosa 0,25 mM, EDTA 1 mM, Tris 10 mM y un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics GmbH); posteriormente, las muestras se centrifugaron a 14000 g durante 10 minutos a 4°C y los supernadantes (50 μ g de proteína) se incubaron durante 1 hora a 37°C en un tampón HEPES, que contenía 100 μ M del sustrato fluorogénico específico Ac (N-acetil)-DEVD-AMC (Alexis Biochemicals, San Diego, California, EE.UU.).

El procesamiento del sustrato fluorogénico se monitorizó por medio de un lector espectrofluorímetro de microplacas Synergy HT (BioTek) a unas longitudes de onda de excitación/emisión de 380/460 nm. La actividad se expresó como unidades arbitrarias de fluorescencia por miligramo de proteína por minuto de incubación (UAF/mg prot/min).

3.5.2 Tratamiento estadístico

Para la expresión de los resultados se calculó el valor de la media y el error estándar de la media (EEM).

Para el análisis estadístico de los resultados se realizó el test de análisis de varianza (ANOVA). Además, en aquellos grupos donde aparecían diferencias significativas, se realizó posteriormente el test de Newman-Keuls.

Se consideró que existían diferencias significativas cuando p<0,05. Para el tratamiento de los datos y su análisis estadístico se utilizó el software comercial SPSS+ versión 19.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, EE.UU.).

4 RESULTADOS

4.1 Efectos del VRHD sobre la respuesta autofágica

4.1.1 Expresión de la proteína viral de la cápside VP60

El VRHD es un virus ARN monocatenario con polaridad positiva. Posee una cápside icosaédrica de 40 nm compuesta por 90 dímeros de la proteína de la cápside VP60 y por una proteína estructural minoritaria denominada VP2, encargada de regular los niveles de proteínas de la cápside viral (Chen y cols., 2009). El nivel de expresión de la proteína VP2 es muy bajo, se ha estimado que alrededor de la quinta parte de la expresión de VP60 (Meyers, 2003); por tanto, para determinar la presencia del virus en los hepatocitos infectados determinamos la expresión del ARNm de VP60 como marcador viral en las diferentes muestras mediante RT-PCR (Figura 31).



Figura 31. Expressión relativa de ARNm de VP60, analizada mediante ensayo de RT-PCR en los diferentes grupos de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos, se normalizaron con β -actina. Valores medios ± EEM (n=6). *p<0,05 con respecto al grupo Control.

La expresión relativa de ARNm de VP60 se detectó a partir de las 18 hpi, y aumentó significativamente desde las 24 hpi en conejos infectados con el VRHD.

Para comprobar *in situ* la presencia del virus se determinó la expresión de la proteína VP60 por inmunohistoquímica en los diferentes periodos de la infección empleando el antígeno viral VP60 (Figura 32). En el grupo de los conejos Control la inmunohistoquímica para VP60 fue negativa. El antígeno viral se detectó por primera vez en los hepatocitos de los conejos infectados a las 18 hpi. La extensión de la expresión inmunohistoquímica se incrementó de forma marcada a las 24 hpi (+25%), apreciándose, además, principalmente en los hepatocitos del área periportal. A las 30 y 36 hpi, las secciones hepáticas presentaron una gran inmunorreactividad frente al antígeno viral VP60, en comparación con el grupo Control (+60% y +90%, respectivamente).



Figura 32. Detección inmunohistoquímica de la expresión hepática del antígeno viral VP60 en los diferentes grupos de estudio. Aumentos: 200x. El gráfico inferior muestra el % de hepatocitos inmunorreactivos de los diferentes grupos de estudio en función del tiempo. Valores medios \pm EEM (n=6). **p*<0,05, respecto al grupo VRHD12.

4.1.2 Detección de vesículas autofágicas en hepatocitos infectados por el VRHD mediante microscopía electrónica de transmisión

Se realizaron diversos análisis con el fin de comprobar el efecto del VRHD sobre la respuesta autofágica. La MET ha sido establecida como método estándar para la monitorización de la autofagia; además, junto con la localización inmunohistoquímica de LC3, permite la detección de autofagosomas.

En el presente estudio, se observó mediante MET una apariencia normal de los hepatocitos de los conejos del grupo Control y un aumento de estructuras autofágicas a partir de las 12 hpi (Figura 33). A las 18 y 24 hpi se detectaron un mayor número de diferentes estructuras autofágicas tales como fagóforos y autofagosomas de doble membrana con orgánulos dañados engullidos y autolisosomas con una gran vacuola

con restos celulares en su interior. Además, en estos periodos tempranos de la infección, se observó un mayor número de lisosomas y mitocondrias así como un aumento de su densidad. Las imágenes revelan un elevado número de vacuolas autofágicas en diferentes estadios (flechas negras). Asimismo, se observó una necrosis citoplásmica más intensa en los hepatocitos del área periportal que en los de la centrolobulillar, caracterizada por una acumulación de materiales biliares electrodensos y un marcado aumento en el número de lisosomas. Las microvellosidades del canalículo biliar se encontraron hinchadas y atrofiadas. En los periodos finales de la infección (30 y 36 hpi) se observó una condensación y agregación de la cromatina en la periferia de la membrana nuclear y una vacuolización citoplásmica de los hepatocitos (flechas negras), signos característicos de la apoptosis (Figura 33).



Figura 33. Microfotografías electrónicas de las secciones hepáticas de los diferentes grupos de estudio. A: Control, B: VRHD12; C: VRHD18; D: VRHD24; E: VRHD30; F: VRHD36. Aumentos: 5000-15000x.

4.1.3 Efecto del VRHD sobre diversos marcadores de la respuesta autofágica

La monitorización estática de los niveles de autofagosomas no es suficiente para dilucidar los efectos del VRHD sobre el mecanismo autofágico, ya que la acumulación de autofagosomas podría ser el resultado tanto de un aumento en su formación como de una disminución en el subsecuente proceso de fusión con los lisosomas (Mizushima y cols., 2010). Por tanto, con el fin de examinar la autofagia en conejos infectados con el VRHD y evitar malinterpretaciones, se decidió combinar el estudio de diferentes marcadores autofágicos mediante técnicas de inmunohistoquímica, Western Blot, y RT-PCR. El complejo Atg12-Atg5-Atg16L1 es un sistema de conjugación tipo ubiquitina, esencial para la formación de los autofagosomas, que se sitúa en la cara externa de la membrana de aislamiento que inicia el proceso autofágico (Fukuda e Itoh, 2008).



Figura 34. Expressión relativa de ARNm de los componentes del complejo Atg12-Atg5-Atg16L1, analizada mediante ensayo de RT-PCR en los diferentes grupos de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos se normalizaron con β -actina. Valores medios ± EEM (n=6). *p<0,05 con respecto al grupo Control.

Para confirmar que la infección mediante el VRHD promueve la activación del mecanismo autofágico, se cuantificó mediante RT-PCR la expresión relativa de ARNm de los diferentes componentes del complejo en los diversos periodos infectivos. Los resultados obtenidos indicaron que los niveles de ARNm de Atg12 y Atg5 aumentaron desde las 12 hpi (Atg12: +73%, Atg5: +25%), y los de Atg16L1 lo hicieron a partir de las 18 hpi, coincidiendo los niveles de ARNm de todos los componentes del complejo con valores máximos a las 18 hpi (Atg16L1: +123%, Atg12: 196%, Atg5: +63%) y permaneciendo significativamente elevados a las 24 hpi (Atg16L1: +40%, Atg12: +77%, Atg5: +39%). Sin embargo, a las 30 y 36 hpi los niveles disminuyeron hasta los valores del grupo Control, y en el caso de Atg5, incluso fueron inferiores (Figura 34).

La formación del complejo Beclina-1-PI3K es un elemento crítico en la vía de señalización de la autofagia (Wirawan y cols., 2012). Los niveles de ARNm de Beclina-1 aumentaron a las 18 (+103%) y 24 hpi (+153%); no obstante, en los últimos periodos de la infección, 30 y 36 hpi, se observó una marcada reducción de los niveles de ARNm hasta los valores del grupo Control (Figura 35), en paralelo a los cambios detectados en los componentes del sistema tipo ubiquitina, Atg12-Atg5-Atg16L1 (Figura 34).



Figura 35. Expresión relativa de ARNm de Beclina-1, analizada mediante ensayo de RT-PCR en los diferentes grupos de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos se normalizaron con β -actina. Valores medios ± EEM (n=6). **p*<0,05 con respecto al grupo Control.

El proceso autofágico mediado por el complejo Beclina-1-PI3K es regulado por UVRAG, que interactúa con Beclina-1 en las fases tempranas, permitiendo la activación de la autofagia a través de la maduración de los autofagosomas (Zhao y cols., 2012). La expresión del ARNm de UVRAG reveló un valor máximo a las 18 hpi (+127%), coincidiendo con los cambios observados en la expresión del ARNm de Beclina-1, comenzando más tarde a disminuir (Figura 36).



Figura 36. Expresión relativa de ARNm de UVRAG, analizada mediante ensayo de RT-PCR en los diferentes grupos de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos se normalizaron con β -actina. Valores medios ± EEM (n=6). *p<0,05 con respecto al grupo Control.

Además del complejo Atg12-Atg5-Atg16L1, existe un segundo sistema de conjugación tipo ubiquitina, que es el constituido por LC3 y PE. La LC3 es esencial en la formación de autofagosomas y, por tanto, es una proteína ampliamente empleada como marcador de autofagia (Wang y cols., 2013b). Como se muestra en la Figura 37, la inmunorreactividad para LC3 fue negativa en las secciones hepáticas pertenecientes a los conejos del grupo Control. El antígeno LC3 fue detectado en los hepatocitos de conejos infectados ya desde las 12 hpi (+90%). A las 18 hpi la inmunorreactividad para LC3 aumentó significativamente (+198%) hasta alcanzar un valor máximo a las 24 hpi (+207%). Sin embargo, en los periodos más avanzados de la infección, 30 y 36 hpi, el número de hepatocitos marcados fue menor, no existiendo diferencias significativas respecto al grupo Control (+10% y +2%, respectivamente).



Figura 37. Detección inmunohistoquímica de la expresión hepática del antígeno viral VP60 en los diferentes grupos de estudio. Aumentos: 200x. El gráfico inferior muestra el % de hepatocitos inmunorreactivos en función del tiempo. Valores medios \pm EEM (n=6). **p*<0,05, respecto al grupo Control.

Agentes estresantes, tales como algunos virus, regulan positivamente la expresión de LC3 y promueven la unión de la LC3-I citosólica a la PE para formar la LC3-II que es la forma lipidada específica del autofagosoma, que permanece anclada a la membrana interna, lo que le convierte en un excelente marcador de autofagosomas. Por tanto, la conversión de LC3-I a LC3-II es un claro y específico marcador de la autofagia, esencial para la formación de autofagosomas (Deretic y Levine, 2009). Al analizar los homogeneizados hepáticos mediante Western Blot, para detectar las diferente formas de LC3, se observó un significativo incremento en la expresión de LC3-II a las 18 (+260%) y 24 hpi (+250%), que fue menor a las 30 (+70%) y 36 hpi (+10%) (Figura 38).



Figura 38. Expresión hepática de la proteína LC3I/II. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de GAPDH. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios ± EEM (n=6). **p*<0,05 con respecto al grupo Control.

Los resultados obtenidos mediante MET, la localización inmunohistoquímica del marcador antigénico LC3 y la expresión hepática de la proteína LC3-II, inequívocamente demuestran que en conejos infectados con el VRHD se induce la autofagia en los estadios tempranos de la infección.

Posteriormente, estudiamos mediante RT-PCR y Western Blot el sustrato específico de autofagia p62/SQSTM1, una proteína adaptadora cuyo papel fundamental es mediar la autofagia selectiva capturando proteínas ubiquitinadas para fijarlas a LC3-II en el autofagosoma con el fin de que sean degradadas posteriormente (Pankiv y cols., 2007). Los niveles de ARNm de p62/SQSTM1 aumentaron desde las 12 hpi, siendo significativos a partir de las 18 hpi (+92%) y alcanzando un valor máximo a las 24 hpi (+102%); posteriormente, se observó una disminución a las 30 (-14%) y 36 hpi (-31%) (Figura 39). Estos cambios se correspondieron con los análisis por Western blot donde constatamos un aumento en la expresión de la proteína p62/SQSTM1 a las 18 y 24 hpi y una disminución en los valores de la misma en los últimos periodos infectivos (Figuras 40). Estos datos podrían ser el reflejo de una autofagia incompleta con un insuficiente flujo autofágico.



Figura 39. Expresión relativa de ARNm de p62/SQSTM1, analizada mediante ensayo de RT-PCR en los diferentes grupos de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos se normalizaron con β -actina. Valores medios ± EEM (n=6). **p*<0,05 con respecto al grupo Control.



Figura 40. Expresión hepática de la proteína p62/SQSTM1. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de GAPDH. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios \pm EEM. (n=6). p<0,05 con respecto al grupo Control.

Una de las principales vías de señalización que regulan la autofagia está modulada por mTOR. En condiciones estables de nutrientes celulares, actúa como un regulador negativo de la autofagia, mientras que la represión de mTOR, mediante una privación de los nutrientes del medio o bien mediante el tratamiento con rapamicina, induce el proceso autofágico (Jung y cols., 2010). Sin embargo, el mecanismo de

regulación de la autofagia por parte de mTOR durante la infección viral es complejo, y se ha descrito que algunos virus activan la vía de señalización de mTOR (Shrivastava y cols., 2012; Tovilovic y cols., 2014). Por ello, se analizó la expresión hepática de p-mTOR mediante Western Blot durante los diferentes periodos de la infección (Figura 41). Se observó un incremento progresivo de la expresión hepática de p-mTOR a las 12 (+75%), 18 (+100%) y 24 hpi (+125%) en animales infectados con el VRHD. Sin embargo, a las 30 hpi, los niveles en el hígado de p-mTOR disminuyeron hasta valores por debajo de los del grupo Control (-47%), y a las 36 hpi fueron indetectables.



Figura 41. Expresión hepática de la proteína mTOR y de su forma fosforilada, p-mTOR. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de GAPDH. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios ± EEM (n=6). *p<0,05 con respecto al grupo Control.

4.1.4 Importancia del estrés del RE en la respuesta autofágica inducida por el VRHD

Aunque no se ha determinado el papel de la autofagia en la función normal del RE, y no se conoce en profundidad la relación entre ambos, existen diversos estudios que indican que el proceso autofágico está asociado al RE y puede formar una parte importante de la función normal del RE (Ogata y cols., 2006).

La autofagia inducida mediante la activación de las vías del estrés del RE juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis celular aminorando el estrés causado por el acúmulo de proteínas mal plegadas en el lumen del RE, ya que el proceso autofágico puede ser utilizado como un mecanismo alternativo de
degradación. Como se ha expuesto anteriormente, durante el estrés del RE varios factores de transcripción regulan la expresión de chaperonas del RE tales como CHOP, BiP/GRP78 y GRP94, aumentando así la capacidad de plegamiento en el RE.



Figura 42. Expressión relativa de ARNm de las chaperonas del RE BiP, CHOP y GRP94, analizada mediante ensayo de RT-PCR en los diferentes grupos de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos se normalizaron con β -actina. Valores medios ± EEM (n=6). * p<0,05 con respecto al grupo Control.

BiP es una proteína chaperona del RE necesaria para el plegamiento de proteínas. Estudios recientes han demostrado que posee un papel fundamental en la modulación de la sensibilidad y duración de la UPR (Gardner y Walter, 2011). La expresión hepática de BiP se cuantificó mediante RT-PCR (Figura 42). Los resultados mostraron un aumento progresivo en los niveles del ARNm de BiP en los diferentes periodos de la infección alcanzando un valor máximo a las 24 hpi (+204%). Además, se confirmó la activación de la UPR en conejos infectados con el VRHD mediante la cuantificación de los niveles de ARNm de CHOP, principal marcador de la respuesta al estrés del RE, y de GRP94, una chaperona molecular y proteína residente del RE implicada en el plegamiento de proteínas secretoras y de membrana (Takayanagi y cols., 2013). Los datos obtenidos mostraron un valor máximo en la expresión de ambas chaperonas a las 24 hpi (CHOP: +440%, GRP94: +312%) (Figura 42).

4.1.5 Importancia de la apoptosis hepática en la respuesta autofágica inducida por el VRHD

El mecanismo de autofagia mantiene una compleja relación con la apoptosis, ya que la autofagia puede inhibir o promover la muerte celular; además, por otro lado, estudios recientes afirman a su vez que la apoptosis es capaz de inhibir la maquinaria autofágica (Wang y cols., 2013d). Se sabe también que la autofagia juega un papel fundamental a la hora de determinar el destino de las células infectadas por virus mediante el bloqueo o la inducción de los mecanismos apoptóticos (Tovilovic y cols., 2014).



Figura 43. Actividad hepática de la caspasa 3 en los diferentes grupos de estudio. La actividad se expresa como unidades de fluorescencia por miligramo de proteína por minuto de incubación. Valores medios \pm EEM (n=6). *p<0,05 con respecto al grupo Control.

Diferentes estímulos que inducen apoptosis provocan como evento final la activación de la caspasa 3 (Mauriz y cols., 2003). En este estudio las muestras se incubaron con el sustrato fluorogénico específico Ac-DEVD-AMC cuya escisión indicó que la infección por el VRHD se tradujo en un marcado aumento de la actividad de la caspasa 3 en los últimos periodos de la infección, 30 (+275%) y 36 hpi (+292%) (Figura 43).

PARP-1 es una enzima nuclear catalítica, que es activada cuando hay interrupciones en la cadena de ADN. La familia de la caspasa 3 es el principal responsable de su división en un fragmento de 85 kDa, cuya presencia confirma que las células experimentan apoptosis (San-Miguel y cols., 2006). En nuestros experimentos, los análisis de Western Blot mostraron que durante los periodos tardíos de la infección, 30 y 36 hpi, la proteólisis de PARP-1 aumentó significativamente (+203% y +298%, respectivamente) (Figura 44).



Figura 44. Expresión hepática de la proteína PARP-1. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de GAPDH. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios \pm EEM (n=6). *p<0,05 con respecto al grupo Control.

Con el fin de profundizar en el conocimiento de las posibles relaciones entre la autofagia y la apoptosis, se analizó mediante Western Blot la expresión hepática de dos proteínas antiapoptóticas implicadas en la vía intrínseca de la apoptosis, Bcl-2 y Bcl-xL (Tuñón y cols., 2011a). La expresión hepática de Bcl-2 aumentó a las 12 hpi (+62%); sin embargo, durante los periodos infectivos finales, 30 y 36 hpi, los datos

mostraron una inhibición significativa en la expresión de ambas proteínas (Bcl-2, 30 hpi: -20%, 36 hpi: -30%; Bcl-xL, 30 hpi: -75%, 36 hpi: -82%) (Figura 45).



Figura 45. Expresión hepática de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de GAPDH. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios ± EEM (n=6). p<0,05 con respecto al grupo Control.

4.2 Efecto de la melatonina sobre la respuesta autofágica inducida por el VRHD

Una vez comprobado el papel de la autofagia en la replicación vírica, decidimos estudiar, en un segundo protocolo experimental, el efecto de la melatonina sobre la respuesta autofágica inducida por el VRHD desde las 18 hpi, dado que en periodos anteriores no se detectó la presencia del virus y los cambios no fueron significativos en todos los marcadores autofágicos.

4.2.1 Efecto de la melatonina sobre marcadores de estrés oxidativo asociados a la respuesta autofágica inducida por el VRHD

El glutatión se presenta en su forma oxidada, GSSG, que es convertida rápidamente mediante la enzima GR a su forma reducida, GSH. En este estudio, se determinó, como marcador de estrés oxidativo, la relación entre las concentraciones de GSSG/GSH. El estrés oxidativo es un proceso común en diferentes modelos animales de FHF, y parece jugar un importante papel en la patogénesis de la enfermedad, contribuyendo a la muerte celular por apoptosis (San-Miguel y cols., 2006).

	Control	18 hpi	24 hpi	30 hpi	36 hpi
GSH (mmol/g de tejido)					
VRHD	20,6 ± 0,62	19,3 ± 1,3	17,1 ± 0,88 ^ª	12,7 ± 2,9 ^ª	10,2 ± 2,1 ^ª
VRHD+Mel	22,1 ± 0,36	21,8 ± 0,91	20,9 ± 0,54 ^{ab}	19,4 ± 1,1	16,1 ± 1,8 ^{ab}
GSSG (mmol/g de tejido)					
VRHD	0,84 ± 0,08	0,89 ± 0,1	0,92 ± 0,1	1,1 ± 0,37 ^ª	1,4 ± 0,51 ^ª
VRHD+Mel	0,80 ± 0,1	0,88 ± 0,07	0,87 ± 0,09	0,90 ± 0,08 ^b	0,95 ± 0,09 ^b

Tabla 4. Concentraciones hepáticas de GSH y GSSG en los diferentes grupos de estudio. Valores medios \pm EEM (n=4). ^ap<0,05 con respecto al grupo Control. ^bp<0,05 con respecto a los grupos VRHD, mismo periodo.

El GSH actúa como neutralizador de diferentes RL y es una de las principales defensas contra el estrés oxidativo (Crespo y cols., 2008). El GSH disminuyó significativa y progresivamente en los animales infectados a lo largo del tiempo postinfección hasta las 36 hpi (-50,5%), mientras que, en este mismo periodo, se produjo un aumento significativo en la concentración de GSSG (+66,7%) (Tabla 4). La infección experimental con el VRHD se tradujo en un aumento significativo en la relación GSSG/GSH en los grupos de conejos infectados a las 18 (+13%), 24 (+31,9%), 30 (+112,3%) y 36 hpi (+238,2%). Estos efectos se previnieron en parte en los grupos que recibieron melatonina a las 18 (GSSG/GSH: -12,4%, GSH: +13%) y 24 hpi

(GSSG/GSH: -22,7%, GSH: +22,2%), y de forma significativa en los grupos que recibieron melatonina a las 30 (GSSG/GSH: -46,4%, GSH: +52,8%) y 36 hpi (GSSG/GSH: -57,3%, GSH: +57,9%) (Figura 46).



Figura 46. Relación hepática GSSG/GSH de los diferentes grupos de estudio. Valores medios \pm EEM (n=4). ^ap<0,05 con respecto al grupo Control. ^bp<0,05 con respecto a los grupos VRHD, mismo periodo.

4.2.2 Efecto de la melatonina sobre la expresión de la proteína viral de la cápside VP60

Una vez determinada la presencia del virus en los hepatocitos infectados con el VRHD, decidimos observar los efectos de la melatonina sobre la replicación vírica en los diferentes grupos de estudio. Para ello, se determinó la expresión del ARNm de VP60 y se realizó un análisis inmunohistoquímico frente al antígeno viral VP60. El tratamiento con melatonina resultó en una marcada reducción en la expresión del ARNm de VP60 en los grupos de conejos infectados con el VRHD a partir de las 24 hpi (-28,7%) hasta las 36 hpi (-42,3%), observándose una marcada disminución a las 30 hpi (-42,3%) (Figura 47). Además, la administración del indol provocó una significativa disminución de la inmunorreactividad frente a VP60 en los grupos de animales infectados a las 24 (-80%), 30 (-31,7%), y 36 hpi (-31,1%) (Figura 48), revelando la capacidad inhibidora de la melatonina frente a la replicación viral.



Figura 47. Expresión relativa de ARNm de VP60, analizada mediante ensayo de RT-PCR en los distintos grupos de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos, se normalizaron con β -actina. Valores medios ± EEM (n=4). ^ap<0,05, con respecto al grupo Control. ^bp<0,05, con respecto a los grupos VRHD, mismo periodo.



Figura 48. Detección inmunohistoquímica de la expresión hepática del antígeno viral VP60 en los diferentes grupos de estudio. Aumentos: 200x. El gráfico inferior muestra el % de hepatocitos inmunorreactivos en función del tiempo. Valores medios \pm EEM (n=4). ^ap<0,05, con respecto al grupo Control. ^bp<0,05, con respecto a los grupos VRHD, mismo periodo.

4.2.3 Efecto de la melatonina sobre diversos marcadores de la respuesta autofágica inducida por el VRHD

Habiendo puesto de manifiesto que la infección con el VRHD in vivo inicia una rápida respuesta autofágica, nuestro grupo de investigación decidió dilucidar el efecto de la melatonina sobre dicha respuesta en los diferentes grupos experimentales. Para ello, se estudiaron mediante PCR los niveles de expresión de los principales marcadores autofágicos. Los resultados obtenidos en los grupos infectados mostraron, como era de esperar por los resultados obtenidos en los resultados del primer protocolo experimental, una regulación positiva de los componentes del complejo Atg12-Atg5-Atg16L1 y un aumento significativo de la expresión de Beclina-1 a las 18 y 24 hpi (Atg12, VRHD18: +93%, VRHD24: +35%; Atg5, VRHD18: +70%, VRHD24: +49%; Atg16L1, VRHD18: +77%, VRHD24: +14%; Beclina-1, VRHD18: +122%, VRHD24: +134%) (Figuras 49 y 50). El papel modulador de la melatonina respecto a la activación del mecanismo autofágico comenzó a manifestarse a las 18 hpi, observándose una disminución en los niveles de ARNm de Atg16L1 y Beclina-1 en los grupos de conejos que recibieron el tratamiento (Atg16L1: -42%; Beclina-1: -20%) (Figuras 49 y 50). A las 24, 30 y 36 hpi los niveles de los marcadores autofágicos disminuyeron significativamente en los grupos de conejos que recibieron melatonina respecto a los no tratados en los mismos tiempos postinfección (Atg12, VRHD24+Mel: -30%, VRHD30+Mel: -52%, VRHD36+Mel: -42%; Atg5, VRHD24+Mel: -53%, VRHD30+Mel: -40%, VRHD36+Mel: -48%; Atg16L1, VRHD24+Mel: -50%, VRHD30+Mel: -43%, VRHD36+Mel: -53%; Beclina-1, VRHD24+Mel: -60%, VRHD30+Mel: -41%, VRHD36+Mel: -22%); incluso en algunos casos, los valores resultaron inferiores a los del grupo Control (Atg12, VRHD30+Mel: -57%, VRHD36+Mel: -47%; Atg5, VRHD24+Mel: -30%, VRHD30+Mel: -22%, VRHD36+Mel: -51%; Atg16L1, VRHD24+Mel: -43%, VRHD30+Mel: -51%, VRHD36+Mel: -62%; Beclina-1, VRHD36+Mel: -32%) (Figuras 49 y 50).



Figura 49. Expresión relativa de ARNm de los componentes del complejo Atg12-Atg5-Atg16L1, analizada mediante ensayo de RT-PCR en los diferentes grupos de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos se normalizaron con β -actina. Valores medios ± EEM (n=4). ^ap<0,05 con respecto al grupo Control. ^bp<0,05 con respecto a los grupos VRHD, mismo periodo.



Figura 50. Expresión relativa de ARNm de Beclina-1, analizada mediante ensayo de RT-PCR en los diferentes grupos de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos se normalizaron con β -actina. Valores medios ± EEM (n=4). ^ap<0,05 con respecto al grupo Control. ^bp<0,05 con respecto a los grupos VRHD, mismo periodo.

Como ya se indicó con anterioridad, LC3 es el principal marcador de la autofagia. Los datos de Western blot indicaron que la expresión de LC3-II se incrementó de forma marcada a las 18 y 24 hpi (VRHD18: +100%, VRHD24: +430%), con un incremento máximo de la relación LC3-II/LC3-I a las 24 hpi, lo que sugiere que el VRHD induce la acumulación de autofagosomas en los hepatocitos durante los periodos tempranos de la infección. El tratamiento con melatonina redujo la expresión hepática de LC3 a las 24 hpi (VRHD24+Mel: -28%) sin observarse apenas cambios en los restantes periodos infectivos (Figura 51).



Figura 51. Expresión hepática de la relación LC3-I y LC3-II. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de β -actina. El panel inferior muestra la relación LC3-II/LC3-I. Valores medios ± EEM (n=4). ^ap<0,05 con respecto al grupo Control. ^bp<0,05 con respecto con respecto a los grupos VRHD, mismo periodo.

Como se ha explicado anteriormente, el acúmulo de LC3-II puede ser debido bien a un aumento en la síntesis de autofagosomas, o bien a una disminución en el proceso de fusión con los lisosomas y/o una supresión del reciclaje proteolítico en los autofagolisosomas. Con el fin de dilucidar esta cuestión, se realizó una doble inmunofluorescencia para LC3, marcador de autofagosomas, y LAMP-1, marcador lisosomal, en secciones de hígado de los diferentes grupos de estudio (Figura 52). El análisis de inmunofluorescencia para LC3 mostró zonas de fluorescencia verde que alcanzaron un máximo de expresión a las 24 hpi, sugiriendo un gran reciclaje de autofagosomas. A las 18 hpi se observó una escasa colocalización de LC3 y LAMP-1, pero a las 24 hpi se observó una marcada colocalización, probablemente debido a un aumento en la acumulación de autofagolisosomas en este periodo.



Figura 52. Imágenes de la doble inmunofluorescencia para LC3 y LAMP-1 en secciones hepáticas de los diferentes grupos de estudio. Las imágenes muestran la expresión de LC3 (verde) y LAMP-1 (rojo). El color amarillo visualizó en las imágenes fusionadas la colocalización de LC3 y LAMP-1. Aumentos: 200x.

Con el fin de ahondar más en el papel de la melatonina sobre la respuesta autofágica inducida por el VRHD, se analizó mediante RT-PCR la expresión de la proteína adaptadora p62/SQSTM1 (Figura 53). Los resultados mostraron, en los grupos de animales tratados con melatonina, una reducción significativa en la expresión de p62/SQSTM1 respecto a los grupos de conejos infectados en los mismos tiempos

postinfección (VRHD18+Mel: -31%, VRHD24+Mel: -32%, VRHD30+Mel: -42%, VRHD36+Mel: -35%). A las 30 y 36 hpi, se observó una disminución de los niveles de expresión del ARNm en el grupo de los conejos tratados con melatonina respecto al grupo Control (-25% y -47%, respectivamente).



Figura 53. Expresión relativa de ARNm de p62/SQSTM1, analizada mediante ensayo de RT-PCR en los diferentes grupos de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos se normalizaron con β -actina. Valores medios ± EEM (n=4). ^ap<0,05 con respecto al grupo Control. ^bp<0,05 con respecto a los grupos VRHD, mismo periodo.

En resumen, el tratamiento con melatonina inhibió parcialmente la respuesta autofágica en los grupos de conejos infectados con el VRHD, ya que en estos grupos disminuyó la expresión del ARNm de los marcadores autofágicos Atg12, Atg5, Atg16L1 y Beclina-1 (Figuras 49 y 50), redujo la expresión hepática de la proteína LC3-II (Figura 51), y la inmunorreactividad frente a LC3 fue menor (Figura 52).

4.2.4 Efecto de la melatonina sobre el estrés del RE asociado a la respuesta autofágica inducida por el VRHD

El estrés del RE es un mecanismo que induce la acumulación de autofagosomas, por lo que se piensa que la autofagia podría ser una parte importante de la función normal del RE en condiciones no patológicas (Ogata y cols., 2006). Como se ha indicado anteriormente, la expresión de tres de las chaperonas más importantes del estrés del RE, BiP/GRP78, CHOP y GRP94, aumentan su expresión en las etapas tempranas de la infección por el VRHD. Por tanto, con el fin de corroborar estos efectos y comprobar el papel de la melatonina sobre el estrés del RE asociado al mecanismo autofágico durante el curso de la infección con el VRHD, se analizaron las chaperonas CHOP y BiP/GRP78 mediante RT-PCR (Figura 54). Como era de esperar, de acuerdo a los resultados ya indicados en el anterior protocolo experimental, los niveles de ARNm de ambas chaperonas aumentaron en los diferentes periodos de la infección, alcanzando un valor máximo a las 24 hpi (CHOP, VRHD18: +289%, VRHD24: +572%, VRHD30: +144%; BiP, VRHD18: +164%, VRHD24: +202%, VRHD30: +116%, VRHD36: +29%). Este efecto fue significativamente inhibido en los grupos de conejos infectados que recibieron melatonina (CHOP, VRHD18+Mel: -20%, VRHD24+Mel: -61%, VRHD30+Mel: -44%, VRHD36+Mel: -37%; BiP, VRHD24+Mel: -23%, VRHD30+Mel: -37%, VRHD36+Mel: -39%).



Figura 54. Expressión relativa de ARNm de las chaperonas del RE, CHOP y BiP, analizada mediante ensayo de RT-PCR en los diferentes grupos de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos se normalizaron con β -actina. Valores medios ± EEM (n=4). ^ap<0,05 con respecto al grupo Control. ^bp<0,05 con respecto a los grupos VRHD, mismo periodo.

4.2.5 Efecto de la melatonina sobre la apoptosis hepática asociada a la respuesta autofágica inducida por el VRHD

De acuerdo con los datos obtenidos, presentados en apartados anteriores, se decidió estudiar el efecto de la melatonina sobre los marcadores apoptóticos, en conejos infectados con el VRHD a partir de las 18 hpi con el fin de comparar los resultados respecto a los grupos de animales infectados que no recibieron tratamiento.

Dada la importancia que en la respuesta autofágica tiene la apoptosis (Levine y cols., 2008), se analizó la actividad de la caspasa 3, mediante la incubación de las muestras con el sustrato fluorogénico específico Ac-DEVD-AMC. La escisión del mismo se tradujo en un aumento significativo de la actividad de la caspasa 3 en los últimos periodos infectivos tanto en los animales infectados por el VRHD (30 hpi: +442%, 36 hpi: +500%) como en los infectados que recibieron melatonina (30 hpi: +232%, 36 hpi: +342%) en comparación con el grupo Control sin que se produjeran cambios a las 18 y 24 hpi. No obstante, la administración de melatonina inhibió de forma significativa el incremento a las 30 (-38%) y 36 hpi (-26%) (Figura 55).



Figura 55. Actividad hepática de la caspasa 3 en los diferentes grupos de estudio. La actividad se expresa como unidades de fluorescencia por miligramo de proteína por minuto de incubación. Valores medios ± EEM (n=4). ^ap<0,05 con respecto al grupo Control. ^bp<0,05 con respecto a los grupos VRHD, mismo periodo.

Además, se analizó mediante Western blot los niveles hepáticos de la enzima nuclear catalítica PARP-1, cuya escisión por la caspasa 3 indica la presencia de apoptosis (Mauriz y cols., 2003). Asimismo, los resultados revelaron un mayor aumento de la proteólisis de PARP-1, en los periodos finales de la infección en los animales infectados por el VRHD (30 hpi: +200%, 36 hpi: +245%) respecto a los

infectados que recibieron melatonina (30 hpi: +130%, 36 hpi: +120%) en comparación con los animales pertenecientes al grupo Control. El efecto antiapoptótico de la melatonina pudo constatarse ya que disminuyó de forma significativa los valores de expresión hepática de PARP-1 a las 30 (-23%) y 36 hpi (-36%), respecto de los correspondientes grupos infectados sin tratamiento (Figura 56).



Figura 56. Expresión hepática de la proteína PARP-1. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de Lámina β . El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios ± EEM (n=4). ^ap<0,05 con respecto al grupo Control. ^bp<0,05 con respecto a los grupos VRHD, mismo periodo.

4.3 Efecto de la melatonina sobre el estrés del RE y la apoptosis en el modelo de FHF inducido por el VRHD

En estudios previos nuestro grupo de investigación puso de manifiesto que durante la infección experimental con el VRHD los datos bioquímicos y la expresión de los genes implicados en las diferentes vías moleculares de daño, apoptosis y regeneración cambiaban significativamente entre las 36 y 48 hpi (Tuñón y cols., 2003; García-Lastra y cols., 2010; Tuñón y cols., 2011a,b). Por ello, y una vez constatada la interrelación existente entre el estrés de RE y la apoptosis con la autofagia en los

experimentos descritos con anterioridad, decidimos profundizar en ambos mecanismos y estudiar el efecto de la melatonina en conejos infectados a las 36 hpi. Además, quisimos dilucidar si el efecto de la melatonina sobre los diversos marcadores moleculares a estudiar era o no dependiente de la dosis.

Con el propósito de comprobar el efecto de la melatonina sobre el estrés del RE en conejos infectados con el VRHD, se realizó una técnica inmunohistoquímica frente a la chaperona CHOP, principal marcador que participa en la respuesta al estrés del RE. La inmunorreactividad para CHOP resultó negativa en las secciones hepáticas de los conejos pertenecientes al grupo Control. La melatonina redujo de una forma dependiente de la dosis el marcado incremento en la expresión de CHOP que se produjo en los conejos infectados no tratados (Figura 57).



Figura 57. Detección inmunohistoquímica de la expresión hepática de CHOP en los diferentes grupos de estudio. A: Control, B: VRHD; C: VRHD+Mel10; D: VRHD+Mel20. Aumentos: 400x.

Los factores de transcripción ATF6, ATF4, y XBP1s regulan la expresión de chaperonas del RE que aumentan la capacidad de plegamiento del mismo, como es el caso de CHOP, además de otros genes de estrés, como son BiP/GRP78, GRP94 y TRAF2. Como mostraron los resultados obtenidos en la RT-PCR, la inducción del FHF mediante la infección con el VRHD, produjo un aumento significativo de los niveles de ARNm de PERK, ATF6, ATF4, IRE1, XBP1s, TRAF2, CHOP, BiP y GRP94. En los conejos que recibieron melatonina, la magnitud de los cambios se atenuó significativamente; en el caso de TRAF2 y BiP, los efectos fueron dependientes de la dosis (Tabla 5).

Gen	Control	Control+Mel	VRHD	VRHD+Mel10	VRHD+Mel20
PERK	100±5	96±3	191±16 ^ª	133±13 ^{ab}	144±15 ^{ab}
ATF4	100±4	101±6	183±7 ^a	116±5 ^b	102±5 ^b
ATF6	100±2	108±2	160±10 ^a	99±6 ^b	98±2 ^b
XBP1	100±6	103±8	748±94 ^a	223±57 ^{ab}	169±23 ^{ab}
XBP1s	100±3	113±10	213±18 ^a	154±14 ^{ab}	112±23 ^b
IRE1	100±8	93±4	268±22 ^ª	148±16 ^{ab}	126±6 ^b
TRAF2	100±2	103±3	300±22 ^a	125±8 ^{ab}	94±4 ^{bc}
BiP	100±3	106±5	254±42 ^ª	156±17 ^{ab}	107±13 ^{bc}
СНОР	100±2	103±3	169±16 ^ª	103±3 ^b	109±4 ^b
GRP94	100±2	98±8	285±43 ^ª	141±11 ^{ab}	146±16 ^{ab}

Tabla 5. Expresión relativa de ARNm de diversos marcadores de estrés del RE, analizada mediante ensayos de RT-PCR, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos, se normalizaron con β -actina. Valores medios ± EEM (n=6). ^ap<0,05, en comparación con el grupo Control. ^bp<0,05, en comparación con el grupo VRHD, ^cp<0,05 en comparación con el grupo VRHD+Mel10.

Los resultados obtenidos demuestran que la reducción del daño hepático asociado al tratamiento con la melatonina se asocia con la atenuación directa del estrés del RE mediante la modulación de las tres ramas de la UPR.

En estudios previos, nuestro grupo de investigación ha señalado el papel antiapoptótico de la melatonina al aminorar el aumento de la inmunoexpresión y actividad de la caspasa 3 y la proteólisis de PARP-1 que se producen durante la infección experimental de conejos con el VRHD (Tuñón y cols., 2011a). Por tanto, nuestro objetivo en este estudio ha sido confirmar la correlación entre los niveles de estrés del RE y la muerte celular apoptótica. Para ello se realizó en secciones hepáticas un análisis de doble inmunofluorescencia para CHOP y caspasa 3. La doble tinción indicó la colocalización de CHOP y de la forma activa de caspasa 3 en el hígado de los conejos infectados por el VRHD. La inmunotinción se redujo de forma marcada en las secciones hepáticas de los conejos infectados y tratados con melatonina (Figura 58).



Figura 58. Imágenes de la doble inmunofluorescencia para caspasa 3 y CHOP en secciones hepáticas de los diferentes grupos de estudio. A: VRHD; B: VRHD+Mel10; C: VRHD+Mel20. Las secciones incluidas en parafina fueron teñidas con los anticuerpos caspasa 3 (verde) y CHOP (rojo). El color amarillo visualizó en las imágenes fusionadas la colocalización de CHOP y caspasa 3. Aumentos: 200x.

El estrés del RE induce también la fosforilación de JNK, miembro de la familia de las proteínas quinasas activadas por estrés. Se ha propuesto que su activación es un proceso proapoptótico que actúa a través de la fosforilación directa de proteínas mitocondriales y de la escisión de la caspasa 12, iniciando en cascada la activación de las vías apoptóticas (Zhang y Kaufman, 2008). Por ello, decidimos determinar la expresión hepática de la forma activa fosforilada de JNK, p-JNK, y de la caspasa 12 mediante Western Blot. Una vez más, el efecto antiapoptótico de la melatonina fue evidente ya que se observó una disminución significativa, similar con ambas dosis, de la expresión de p-JNK en comparación con el grupo de animales infectados con el VRHD que no recibieron tratamiento (VRHD+Mel10: -40%, VRHD+Mel20: -43%) (Figura 59).



Figura 59. Expresión hepática de la quinasa JNK y de su forma fosforilada, p-JNK. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de β -actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios ± EEM (n=6). ^ap<0,05 con respecto al grupo VRHD.

El tratamiento con melatonina también inhibió el aumento significativo en la expresión de caspasa 12 que se produce respecto a controles en los conejos infectados con el VRHD (VRHD+Mel10: -30%, VRHD+Mel20: -51%) de una forma dependiente de la dosis (VRHD+Mel20: -30%, comparado con el grupo VRHD+Mel10) (Figura 60).



Figura 60. Expresión hepática de la caspasa 12. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de β -actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios ± EEM (n=6). ^ap<0,05 con respecto al grupo Control. ^bp<0,05 con respecto al grupo VRHD. ^cp<0,05 con respecto al grupo VRHD.

Una vez conocido el mecanismo de activación del estrés del RE a través de las tres vías principales de la UPR en nuestro modelo animal de FHF de etiología vírica, decidimos evaluar si la inhibición del estrés del RE y la inhibibión de la UPR es un mecanismo subyacente a los efectos antiapoptóticos de la melatonina. Por tanto, con el fin de profundizar en los posibles efectos de la melatonina sobre los factores implicados en la vía de señalización del estrés del RE y la UPR, se analizó mediante Western Blot la expresión hepática de las proteínas ATF6 α , CHOP, p-IRE1, XBP1s, BiP y p-PERK en extractos de tejido. Los resultados obtenidos indicaron que la infección por el VRHD incrementó la expresión hepática de estas proteínas. Sin embargo, estos aumentos disminuyeron significativamente en los grupos de conejos que recibieron tratamiento con melatonina (ATF6 α , VRHD+Mel10: -49%, VRHD+Mel20: -56%; CHOP, VRHD+Mel10: -30%, VRHD+Mel20: -67%; p-IRE1, VRHD+Mel10: -17%, VRHD+Mel20: -29%; XBP1s, VRHD+Mel10: -17%, VRHD+Mel20: -29%; p-PERK, VRHD+Mel20: -63%; BiP, VRHD+Mel10: -35%, VRHD+Mel20: -39%) (Figuras 61, 62, y 63).



Figura 61. Expressión hepática de ATF6 α y de CHOP. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de β -actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios ± EEM (n=6). ^ap<0,05, con respecto al grupo vRHD, ^cp<0,05 con respecto al grupo VRHD.



Figura 62. Expresión hepática de p-IRE1 y de XBP1s. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de β -actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo control. Valores medios ± EEM (n=6). ^ap<0,05, con respecto al grupo Control. ^bp<0,05, con respecto al grupo VRHD, ^cp<0,05 con respecto al grupo VRHD.



Figura 63. Expresión hepática de BiP, PERK, y de su forma fosforilada, p-PERK. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de β -actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios ± EEM (n=6). ^ap<0,05, con respecto al grupo VRHD, ^cp<0,05 con respecto al grupo VRHD+Mel10.

5 DISCUSIÓN

5.1 Efecto del VRHD sobre la respuesta autofágica

5.1.1 Expresión de la proteína viral de la cápside VP60

En este estudio se empleó el ARNm de la VP60 como marcador viral, observándose un aumento exponencial en su expresión relativa a partir de las 18 hpi. El incremento fue marcado a partir de las 24 hpi, alcanzando su máximo a las 36 hpi.

El VRHD, como se ha indicado anteriormente, es un virus ARN de cadena simple con polaridad positiva que posee una proteína estructural de la cápside mayoritaria: la VP60. Ésta, además de jugar un papel muy importante en el diagnóstico, es la principal diana molecular de la defensa inmunológica del hospedador contra el VRHD (Esteves y cols., 2008), ya que es inmunodominante y posee los principales epítopos neutralizantes (Abrantes y cols., 2012).

Se realizó una técnica inmunohistoquímica frente a la VP60 con el objetivo de comprobar la presencia *in situ* del VRHD en los diferentes periodos de la infección. La inmunohistoquímica fue negativa en el grupo de los conejos Control y en el grupo de los sacrificados a las 12 hpi; sin embargo, a las 18 hpi se identificó en las secciones hepáticas, aumentando significativamente a las 24 hpi, sobre todo en los hepatocitos del área periportal. En periodos más tardíos de la infección, 30 y 36 hpi, se constató una marcada inmunorreactividad frente al antígeno viral VP60. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores (Abrantes y cols., 2012).

Los conejos por debajo de las 6-8 semanas de vida son resistentes a la enfermedad. No obstante, se ha detectado el antígeno viral en conejos infectados experimentalmente desde las dos semanas de edad (Mikami y cols., 1999), aunque en la mayoría de los estudios únicamente ha sido identificado a partir de las cuatro semanas de vida (Prieto y cols., 2000; Shien y cols., 2000). Los antígenos virales se distribuyeron de forma dispersa y estaban presentes únicamente en un pequeño porcentaje de células. Sin embargo, esto sugiere que algunos hepatocitos en conejos jóvenes son capaces de permitir la replicación viral. Además, la presencia del virus parece temporal, ya que no se ha conseguido detectar antígenos virales después del cuarto día de infección (Shien y cols., 2000).

5.1.2 Detección de vesículas autofágicas en hepatocitos infectados por el VRHD mediante microscopía electrónica de transmisión

La autofagia fue por primera vez monitorizada mediante MET hace más de 50 años (Eskelinen y cols., 2011). La degradación de las áreas citoplasmáticas aisladas por el fagóforo es el distintivo morfológico del proceso autofágico. El uso de la MET es un método válido para el análisis cualitativo y cuantitativo de los cambios secuenciales que acontecen en las estructuras autofágicas: fagóforo, autofagosoma, anfisoma, autolisosoma y cuerpo autofágico (Ylä-Anttila y cols., 2009).

Los autofagosomas poseen una doble membrana que normalmente es visible como dos bicapas paralelas separadas por un haz de electrones lucientes; en su interior contienen citosol y/o orgánulos que morfológicamente se presentan intactos, es decir, del mismo modo que aparecen en la célula. Los anfisomas pueden ser identificados en ocasiones por la presencia de pequeñas vesículas internas dentro del autofagosoma. Estas vesículas internas son conducidas al lumen mediante fusión con los endosomas. Las vacuolas autofágicas tardías y los autolisosomas usualmente están formados por una única membrana limitante, contenido citoplásmico y/o orgánulos en diferentes estados de degradación (Klionsky y cols., 2012).

En esta investigación se examinó la aparición del proceso autofágico durante la infección experimental con el VRHD. Del mismo modo que en otros estudios llevados a cabo con virus que promueven la autofagia, el análisis mediante MET mostró que el número y contenido de vesículas autofágicas se encontraba aumentado en las secciones hepáticas de los animales infectados con el VRHD desde periodos tempranos de la infección. Entre las 18 y 24 hpi aumentó el número de lisosomas y de mitocondrias, pudiéndose observar en estos mismos periodos material citoplásmico electrodenso y autofagosomas de doble membrana con orgánulos dañados en su interior.

La MET de secciones ultrafinas permitió localizar vesículas de doble membrana, similares a las que provocan las infecciones con otros tipos de virus ARN de polaridad positiva como flavivirus, poliovirus y coronavirus. Como la mayoría de estos, el VRHD induce cambios en las membranas celulares del hospedador formando distintas estructuras. Por su analogía a otros virus, como el VHC, el VRHD podría inducir la formación de vesículas de doble membrana mediante la activación de la vía de señalización de la autofagia (Ferraris y cols., 2010). El papel específico de la estimulación de la vía de la autofagia por estos virus sigue siendo desconocido (Miller y Krijnse-Locker, 2008), pero se piensa que los autofagosomas recién sintetizados podrían proporcionar un armazón físico para los complejos de replicación donde podría desarrollarse la síntesis de ARN viral (Kirkegaard y cols., 2004; Jackson y cols., 2005; Wong y cols., 2008). Esto podría representar una estrategia para encubrir el ARN viral y ayudar al virus a evadir la respuesta antiviral del hospedador.

5.1.3 Efecto del VRHD sobre diversos marcadores de la respuesta autofágica

Además de la monitorización de la autofagia a través de la MET, en este trabajo se analizó el efecto de la infección con el VRHD sobre varias proteínas encargadas de regular los diversos mecanismos moleculares que dirigen la formación de vesículas autofágicas, desde su iniciación (Beclina-1), hasta su maduración, proceso llevado a cabo por los dos principales sistemas de conjugación tipo ubiquitina: Atg12-Atg5-Atg16L1 y LC3-PE.

Los datos recogidos en el estudio evidenciaron en los animales infectados con el VRHD un aumento en la expresión de los componentes del complejo Atg12-Atg5-Atg16L1 desde los periodos tempranos de la infección junto con un incremento en la inmunorreactividad frente a la LC3, y en la conversión de la LC3-I citosólica soluble a su forma lipidada, LC3-II, isoforma asociada a la formación de los autofagosomas. Estos resultados inequívocamente demuestran que, en los estadios tempranos de la infección experimental de conejos con el VRHD, se induce la autofagia.

La maquinaria autofágica y las proteínas Atg, de naturaleza multifuncional y altamente adaptable, son alteradas por numerosos patógenos virales con el fin de desarrollar funciones que favorezcan su replicación. Numerosos virus tales como el VIH-1, VHB, VHC y poliovirus han desarrollado mecanismos para anular o subvertir la maquinaria autofágica con el fin de aumentar la replicación viral (Yordy e Iwasaki, 2011). Después de analizar los marcadores autofágicos más representativos, empleando diversas técnicas moleculares, se observaron valores aumentados de la mayoría de ellos en los conejos infectados con el VRHD entre las 18 y 24 hpi; sin embargo, durante los estadios infectivos posteriores, a las 30 y 36 hpi, los niveles de expresión hepática de marcadores como la LC3-II y los niveles de ARNm de los componentes del complejo Atg12-Atg5-Atg16L1 disminuyeron incluso, en algunos casos, hasta valores por debajo de los del grupo Control.

Algunos virus, como los poliovirus, rhinovirus, y el VHM-3, inducen autofagia en su propio beneficio para mejorar su ciclo biológico. Estos virus modifican la maquinaria autofágica y son capaces de utilizar la membrana autofagosomal como lugar de replicación (Ke y Chen, 2012). Por consiguiente, teniendo en consideración los resultados observados en los principales marcadores autofágicos y el aumento exponencial de la expresión hepática de la VP60 durante el transcurso de la enfermedad, cabría pensar que el VRHD induce la autofagia desde los periodos tempranos de la infección con el fin de aumentar su replicación.

Mediante RT-PCR se confirmó la activación y sobreexpresión de uno de los genes clave en la regulación del proceso autofágico: Beclina-1. Se observó un aumento significativo en la expresión relativa del ARNm de esta proteína en los grupos de animales infectados frente a los del grupo Control, lo que sugiere que esta proteína posee un papel crucial en la inducción de la respuesta autofágica por el VRHD. También se analizó la expresión relativa del gen UVRAG, que interactúa con Beclina-1 durante las fases tempranas de la autofagia, contribuyendo así en el proceso de maduración de los autofagosomas (Zhao y cols., 2012). Nuestros resultados mostraron un valor máximo en la expresión de UVRAG a las 18 hpi. Aunque la sobrerregulación de

Beclina-1 es un hallazgo frecuente tras una infección viral (Kudchodkar y Levine, 2009), existen casos, como en la infección por enterovirus 71, en los que la inducción de la autofagia es independiente de Beclina-1 (Huang y cols., 2009); además, también se ha observado un aumento tardío y más bien limitado de la expresión de esta proteína proautofágica en la infección por VHS-1 (Tovilovic y cols., 2013).

En el presente trabajo, la expresión de la p62/SQSTM1 aumentó desde las 12 hpi y se mantuvo elevada hasta las 24 hpi. La p62/SQSTM1 es una proteína multifuncional, implicada en la captura de proteínas ubiguitinadas y es la encargada de transportar la carga seleccionada para ser eliminada hasta el autofagosoma. La p62/SQSTM1 interactúa con la LC3 y es degradada específicamente por la vía autofágica lisosomal, por lo que su cuantificación permite detectar el flujo autofágico (Pankiv y cols., 2007). Infecciones con diferentes herpesvirus producen una disminución de la p62/SQSTM1 en paralelo con un incremento de la proteína LC3-II (Takahashi y cols., 2009; Montagnaro y cols., 2013). Sin embargo, la expresión sobrerregulada de ambas, p62/SQSTM1 y LC3, se ha descrito en diferentes tipos de tumores, cuyo crecimiento es significativamente inhibido por la regulación decreciente de la p62/SQSTM1 (Ren y cols., 2013). Además, la expresión de la p62/SQSTM1 y de la LC3-II también aumenta en los hígados de pacientes con cirrosis biliar primaria y en células epiteliales biliares en cultivo tratadas con peróxido de hidrógeno (Sasaki y cols., 2012). En células Huh 7.5 se ha descrito que tras la transfección con el ARN del VHC existe un contínuo incremento de la p62/SQSTM1, lo que indica que el VHC no aumenta la degradación de proteínas autofágicas (Sir y cols., 2008). Los resultados del presente estudio sugieren una respuesta similar del VRHD, ya que se produce un aumento en la expresión de p62/SQSTM1 durante las primeras fases de la infección, lo que podría reflejar una respuesta incompleta de forma que la capacidad de autofagia no sería suficiente para procesar las proteínas dañadas unidas a p62/SQSTM1.

La mTOR es una molécula importante de señalización que, cuando hay disponibilidad de nutrientes en el medio, actúa como un regulador negativo de la autofagia (Tovilovic y cols., 2013). Cuando la expresión hepática de p-mTOR se cuantificó mediante Western Blot, se observó un aumento de su expresión entre las 12 y 24 hpi, indicando que la infección con el VRHD estimula la vía de señalización de mTOR de forma paralela al desarrollo del proceso autofágico. También se han descrito resultados similares mediante la infección de hepatocitos humanos con el VHC (Shrivastava y cols., 2012), en células de glioblastoma U251 tras la infección con el virus de la enfermedad Newcastle (Meng y cols., 2012), y en células de riñón bovinas infectadas con el herpesvirus bovino tipo 4 (Montagnaro y cols., 2013). Nuestros datos demuestran que en la infección de conejos por el VRHD, mTOR no actúa como regulador negativo durante la respuesta autofágica. Esto podría sugerir que la inducción de la autofagia precede a la activación de la vía de señalización de la mTOR, o que ambos procesos actúan de manera concurrente. Se ha sugerido que en

hepatocitos infectados con el VHC la activación de la mTOR es necesaria para el crecimiento celular a través de la regulación de la proteína fosforilada 1 de unión al factor iniciador eucariótico 4E (EIF4EBP1) (Shrivastava y cols., 2012). No obstante, serían necesarios estudios posteriores con el fin de determinar si hay un requerimiento similar durante el curso de la infección con el VRHD.

5.1.4 Importancia del estrés del RE en la respuesta autofágica inducida por el VRHD

El proceso de autofagia es inducido en respuesta al estrés del RE mediante la activación de la UPR (Ding y cols., 2007). En células de mamífero, la expresión reducida de la proteína reguladora de la UPR, BiP, inhibe la formación de autofagosomas, pero no afecta a la conversión de la LC3-I a LC3-II, sugiriendo que la inducción de estrés del RE es un factor clave para que se desarrolle la autofagia pudiendo desempeñar un papel más importante en la expansión del fagóforo que en la propia inducción (Li y cols., 2008). Estudios previos han demostrado que la inducción de la formación de autofagosomas mediante la infección con el VHC depende de la UPR (Sir y cols., 2008), y que las tres ramas de la UPR contribuyen a regular la replicación del VHC mediante la modulación del mecanismo autofágico (Shinohara y cols., 2013). Se ha descrito también que el ARN del virus del mosaico del tabaco induce autofagia relacionada con el estrés del RE en células HeLa (Li y cols., 2012), y es sabido que la formación de autofagosomas durante la infección con el virus varicela-zóster prosigue al estrés del RE y a la UPR (Carpenter y cols., 2011).

En este trabajo, observamos que los niveles de ARNm de las chaperonas moleculares que tienen un papel principal en el RE: BiP, CHOP y GRP94, alcanzaban los valores máximos a las 24 hpi en paralelo con el aumento en la expresión de Beclina-1 y de los componentes de los dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina: Atg12-Atg-5-Atg16L1 y LC3. Por tanto, estos resultados sugieren que la autofagia podría ser estimulada, al menos en parte, por el estrés del RE. Esta hipótesis es apoyada además por el aumento inducido por el VRHD en la sobrerregulación de Beclina-1, cuya expresión es requerida para la autofagia inducida por el estrés del RE (Li y cols., 2008).

5.1.5 Importancia de la apoptosis hepática en la respuesta autofágica inducida por el VRHD

La interacción entre la autofagia y la muerte celular programada es compleja. La autofagia es un mecanismo citoprotector que permite a las células sobrevivir en condiciones desfavorables para el crecimiento celular y que, además, puede prevenir la muerte celular por apoptosis. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que la autofagia podría contribuir activamente a la muerte celular en células infectadas por virus. Así, se ha descrito en un modelo con un mutante de adenovirus humano tipo 5, que la inhibición farmacológica de la autofagia suprime eficientemente la apoptosis inducida por el virus en fibroblastos de ratón y en células de glioblastoma U251 (Jiang y cols., 2011). El bloqueo de la autofagia también atenúa la muerte celular *in vivo* e *in vitro* causada por el virus de la influenza aviar tipo A subtipo H5N1 (Sun y cols., 2012); por otra parte es sabido que la disminución en la expresión de la Beclina-1 o de la Atg5 protege a las células de rabdomiosarcoma humanas de la muerte apoptótica inducida por el enterovirus 71 (Xi y cols., 2013).

Nuestro grupo de investigación y otros autores han publicado anteriormente que la infección con el VRHD induce en los conejos una marcada respuesta apoptótica entre las 36 y 48 hpi, observándose un incremento de la inmunoexpresión y de la actividad de la caspasa 3, así como una marcada proteólisis de PARP-1 (San-Miguel y cols., 2006; García-Lastra y cols., 2010; Tuñón y cols., 2011a; Niedźwiedzka-Rystwej y Deptuła, 2012). Los resultados del presente estudio indican que la apoptosis está presente en los periodos tardíos de la infección: 30 y 36 hpi. No obstante, no se observaron cambios significativos en la actividad de la caspasa 3, ni en la degradación de PARP-1, ni en la expresión de las proteínas apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL en los estadios tempranos de la enfermedad. El hecho de que la autofagia esté presente en los hepatocitos desde los periodos tempranos de la infección, junto con que estos empiecen a experimentar apoptosis en paralelo con la disminución de la respuesta autofágica, sugiere que la autofagia podría tener un papel beneficioso en el intento de proteger las células de los inminentes efectos nocivos del virus.

Recientemente se ha publicado que los cardiomiocitos expuestos a angiotensina II se comportan de forma similar, es decir, la autofagia es inducida en los periodos tempranos, mientras que la apoptosis tiene lugar en las últimas fases (Wang y cols., 2013d). Por otra parte, en un gran número de estudios, se ha puesto de manifiesto la capacidad de la autofagia, inducida mediante infección vírica, para prevenir o retrasar la muerte en células infectadas. Por ejemplo, la proteína oncógenica X del VHC reduce la muerte celular a través de la inhibición de la apoptosis y la activación de la autofagia (Mao y cols., 2011); y la infección con el virus de la encefalitis japonesa aumenta la activación de las caspasas y la muerte celular en células deficientes en Beclina-1 o Atg5 (Jin y cols., 2013). También se ha descrito que, en células de glioblastoma U251 infectadas con el VHS-1, la respuesta autofágica retrasó significativamente la activación de las caspasas y otros marcadores de la apoptosis (Tovilovic y cols., 2014).

Los datos obtenidos en este estudio también podrían indicar que la respuesta autofágica inducida por el virus desempeña un papel citoprotector, ya que promueve la supervivencia de las células infectadas y sugieren que la autofagia podría contribuir a limitar las consecuencias patológicas asociadas a la muerte celular provocada por la infección con el VRHD. La confirmación de la conexión entre la autofagia y la patogenicidad del VRHD requeriría el uso de sistemas de cultivo celulares que no están disponibles en la actualidad (Abrantes y cols., 2012).

Un hallazgo adicional interesante concierne a la expresión aumentada de la p62/SQSTM1 observada en los hepatocitos infectados. Este resultado refleja una cierta inhibición de la función autofagosoma-lisosomal y que la autofagia es incompleta, lo que podría contribuir a la alteración de la vía de transducción de la señal y a los daños ocasionados en el hígado (Mathew y cols., 2009). De hecho, la sobrerregulación de la p62/SQSTM1 favorece la apoptosis mediante la poliubiquitinación y agregación de la caspasa 8 que es clave en el proceso (Jin y cols., 2009; Huang y cols., 2013b), desempeñando así un papel potencial en la regulación cruzada entre la autofagia y la apoptosis.

5.2 Efecto de la melatonina sobre la respuesta autofágica inducida por el VRHD

5.2.1 Efecto de la melatonina sobre marcadores de estrés oxidativo asociados a la respuesta autofágica inducida por el VRHD

Con el fin de comprobar los efectos de la administración de melatonina sobre los mecanismos de señalización modificados de forma significativa por el VRHD, e indicados en los apartados anteriores, se llevaron a cabo estudios adicionales en grupos de conejos sacrificados a las 18, 24, 30 y 36 hpi. En primer lugar se determinaron diversos marcadores de estrés oxidativo. La relación entre las concentraciones de GSSG y GSH, indicadora fundamental del estado de óxidoreducción celular, se incrementó significativamente en los animales infectados con el VRHD. El estrés oxidativo es un hallazgo común en diferentes modelos animales de FHF, y parece jugar un papel importante en la patogénesis de la enfermedad, contribuyendo a la muerte celular apoptótica (San-Miguel y cols., 2006).

El GSH actúa como neutralizador de diferentes RL y es una de las principales defensas contra el estrés oxidativo (Crespo y cols., 2008). En este estudio se detectó una disminución significativa en los niveles de GSH en los animales infectados por el VRHD a lo largo del curso de la infección, que pudo ser debida a la utilización excesiva de este antioxidante para la eliminación de los RL, a una menor síntesis o una mayor degradación del mismo para generar cisteína, necesaria en otros tejidos potencialmente dañados (García-Lastra y cols., 2010). Sin embargo, en los conejos infectados y tratados con melatonina se observó una reducción significativa de la relación GSSG/GSH en los periodos tardíos de la infección (30 y 36 hpi). Por tanto, estos datos sugieren que la disminución del estrés oxidativo observada mediante la

cuantificación de la relación GSSG/GSH podría contribuir al efecto inhibidor del indol sobre la respuesta autofágica inducida durante la infección viral. Además, los resultados obtenidos confirman, como en estudios previos, que la melatonina es capaz de regular y/o mantener la concentración intracelular de glutatión y prevenir el estrés oxidativo (Reiter y cols., 2000; Crespo y cols., 2010).

Aunque no se sabe si las especies reactivas del oxígeno/nitrógeno provocan respuestas autofágicas específicas, una nueva hipótesis, que está ganando apoyo, afirma que las actividades autofágicas son sensibles al estrés oxidativo y a la acumulación de especies reactivas (Lee y cols., 2012). De hecho, un estudio reciente indica que el estrés oxidativo provoca la acumulación de estructuras autofágicas sin aumentar la degradación de proteínas de vida larga en células de neuroblastoma humanas infectadas por el VHS-1 (Santana y cols., 2013).

5.2.2 Efecto de la melatonina sobre la expresión de la proteína viral de la cápside VP60

Después de determinar y cuantificar la presencia del VRHD en el primer protocolo experimental del presente trabajo, se decidió observar los efectos de la melatonina sobre la replicación viral en los diferentes grupos experimentales. El análisis inmunohistoquímico frente al antígeno viral VP60 reveló una inmunorreactividad disminuida en los grupos de conejos tratados con el indol frente a los no tratados, así como una marcada reducción en la expresión de la proteína VP60, lo que sugiere que la melatonina disminuye la replicación del ARN del VRHD.

Como se indicará más adelante, esta disminución en la replicación del ARN del VRHD en los grupos de animales tratados con melatonina es una consecuencia, al menos en parte, de su efecto negativo en la respuesta al estrés del RE y del mecanismo autofágico. El DENV y el VHC explotan la vía UPR-autofágica para promover su replicación suprimiendo la inmunidad innata antiviral (Zhang y cols., 2005a; Ke y Chen, 2011), y un elevado número de estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la melatonina juega un papel importante en la inmunidad innata (Calvo y cols., 2013).

5.2.3 Efecto de la melatonina sobre diversos marcadores de la respuesta autofágica inducida por el VRHD

Los resultados del primer protocolo experimental realizado demostraron que la infección experimental con el VRHD indujo la formación de autofagosomas y autolisosomas. Se observó un incremento en la expresión de Beclina-1, acompañado de un aumento en la expresión de los dos principales sistemas de conjugación

necesarios para la formación de los autofagosomas, LC3-II y Atg12-Atg5-Atg16L1 en los primeros periodos infectivos (18 y 24 hpi). Además, se monitorizó por inmunofluorescencia la localización de LC3 y LAMP-1 observándose una marcada colocalización a las 24 hpi, posiblemente debido a un aumento en la acumulación de autofagolisosomas. En células no autofágicas, la LC3, marcador de autofagosomas, y la LAMP1, marcador de endosomas tardíos y lisosomas, no colocalizan. Sin embargo, durante la autofagia inducida mediante la infección con el VRHD, LC3 colocaliza con LAMP-1, indicando una nueva disposición intracelular, la maduración de autofagosomas tardíos y/o lisosomas (Munafo y Colombo, 2001; Jackson y cols., 2005). Por otro lado, el aumento paralelo en la expresión de p62/SQSTM1, durante las etapas inciales de la infección, podría reflejar una autofagia incompleta similar a la observada en otros trabajos realizados mediante la infección experimental de hepatocitos con otros virus ARN positivos (Air-Goughoulte y cols., 2008; Sir y cols., 2008).

Como se ha indicado anteriormente, aunque la autofagia podría actuar como un mecanismo celular de eliminación de las partículas virales, diversos virus parecen emplear la respuesta autofágica para aumentar su propia replicación. La producción óptima de los virus ARN positivos depende de la iniciación de la vía autofágica durante la infección. Esto constituye un hecho paradójico, pues el proceso autofágico promueve la degradación del contenido citosólico, y los virus con ARN positivo se replican en el citosol (Richards y Jackson, 2013).

El marcador físico por excelencia de la vía autofágica es la formación de vesículas citosólicas de doble membrana, los autofagosomas. Por ejemplo, la replicación de los poliovirus depende de la formación de esta doble membrana (Taylor y Kirkegaard, 2007); no obstante, si la vía de degradación de los autofagosomas no es alterada por mecanismos del virus, las vesículas se fusionan con los lisosomas y sus contenidos son degradados. Sin embargo, se ha indicado que el enterovirus CVB3 ha desarrollado estrategias para evitar la eliminación de las vesículas mediante la inhibición, durante la infección *in vitro e in vivo*, de la maduración de los anfisomas y de la degradación de proteínas autofágicas (Wong y cols., 2008). Otros virus, como el DENV y los coronavirus, emplean la maquinaria autofágica con el fin de facilitar su replicación (Maier y Britton, 2012; Lee y cols., 2013); y el VHC utiliza la autofagia para la traducción temprana de proteínas (Dreux y cols., 2009).

Los datos obtenidos tras analizar los principales marcadores autofágicos revelaron además que la respuesta autofágica inducida por la infección con el VRHD fue inhibida en los grupos de conejos infectados que recibieron la melatonina. Varios ensayos clínicos han demostrado que el tratamiento con melatonina es eficiente en prevenir el daño celular agudo y crónico. Los efectos beneficiosos de la melatonina pueden ser explicados por sus propiedades como potente antioxidante e inductor de

enzimas antioxidantes, como regulador de la apoptosis y estimulador de las funciones inmunes. Estos efectos apoyan el uso de la melatonina en infecciones virales, ya que están a menudo asociadas con daño inflamatorio y estrés oxidativo, y el indol posee la habilidad de limitar los negativos procesos moleculares que normalmente son activados cuando los virus infectan a las células (Boga y cols., 2012). Los efectos inhibidores de la melatonina sobre la replicación viral observada en este estudio, podrían ser debidos a la menor respuesta autofágica que se produce en los grupos de conejos infectados que recibieron melatonina.

5.2.4 Efecto de la melatonina sobre el estrés del RE asociado a la respuesta autofágica inducida por el VRHD

Los mecanismos que emplean los virus para inducir autofagia siguen siendo desconocidos. Una de las típicas respuestas de estrés iniciada por la infección viral es el estrés del RE, que disminuye la síntesis de proteínas a través de las tres ramas de la UPR. Durante el estrés del RE, diferentes factores de transcripción regulan la expresión de las chaperonas del RE, como CHOP y BiP, quienes aumentan la capacidad de ensamblaje del RE (Zhang y Wang, 2012). Además, es sabido que los sensores de la UPR controlan las vías de señalización de la transducción, permitiendo así la transcripción de genes que regulan el mecanismo autofágico (Huang y cols., 2011); por otro lado, los virus capaces de inducir el estrés del RE tienen el potencial de inducir también la respuesta autofágica. Así, estudios previos han demostrado que la autofagia está asociada al estrés del RE en la infección por el VHC, y que la inducción persistente del estrés del RE junto con la activación incompleta de la autofagia desempeñan un papel importante en la patogénesis del mismo (Sir y cols., 2008; Huang y cols., 2013a). Además, en fibroblastos embrionarios de ratón infectados con el virus Chikungunya, independientemente de la activación de las vías de estrés oxidativo y del RE, el virus es capaz de inducir autofagia mediante la inhibición de mTOR (Joubert y cols., 2012).

Además, el estrés del RE puede inducir la replicación del ARN del VHC a través de la activación de la autofagia, ya que los ARNips dirigidos hacia los sensores de las diversas ramas de la UPR (PERK, IRE1 y ATF6) reducen los niveles de ARN de VHC y suprimen la lipidación de LC3 inducida por la infección con el VHC, necesaria para la formación de los autofagosomas (Sir y cols., 2008). También se ha constatado que los inhibidores de XBP1 inhiben en paralelo la replicación viral del VHC y la autofagia en células de hepatoma (Shinohara y cols., 2013).

Por tanto, la reducción del estrés oxidativo y del RE mediante el tratamiento con melatonina publicado en trabajos anteriores (Crespo y cols., 2010), y confirmado en este estudio a través de la reducción de la expresión de CHOP y BiP en los grupos de
los conejos infectados tratados con la misma, podría contribuir al efecto inhibitorio de la melatonina sobre la respuesta autofágica inducida por el VRHD.

5.2.5 Efecto de la melatonina sobre la apoptosis hepática asociada a la respuesta autofágica inducida por el VRHD

En el presente trabajo de investigación la actividad autofágica inducida por el VRHD disminuyó en los periodos tardíos de la infección (30 y 36 hpi) en paralelo a un aumento de la apoptosis. Varios estudios han indicado que la autofagia inducida mediante infección vírica actúa como un mecanismo de supervivencia siendo capaz de prevenir una muerte celular apoptótica temprana (Joubert y cols., 2012). Como se ha indicado anteriormente, esto podría contribuir a limitar el efecto citopático de ciertos virus y las consecuencias patológicas asociadas con la apoptosis inducida por la infección viral. La regulación de la muerte celular programada a manos de la autofagia podría tener lugar en los hepatocitos infectados con el VRHD. Sin embargo, los mecanismos moleculares que emplea la autofagia en la regulación de la autofagia contundente respuesta apoptótica concomitante al efecto inhibitorio de la autofagia continúan siendo desconocidos.

La melatonina es capaz de inducir o inhibir la autofagia en función de las necesidades celulares y de los niveles de estrés oxidativo. En un estudio realizado en células isquémicas N2a tratadas con melatonina, los procesos de autofagia y de supervivencia celular aumentaron de manera significativa (Guo y cols., 2010). Además, se ha indicado que la autofagia inducida por la melatonina protege contra la neurotoxicidad de priones humanos (Jeong y cols., 2012). Por otra parte, la melatonina induce el proceso autofágico y da lugar a la eliminación efectiva de la TGFBIp, proteína inducida por un mutante de TGF- β en la distrofia corneal granular tipo 2 en fibroblastos (Choi y cols., 2012). Por el contrario, se ha descrito que la melatonina protege del daño celular inducido con rotenone en células HeLa mediante la inhibición de la vía de la autofagia (Zhou y cols., 2012), suprime la autofagia inducida por ciclosporina A en células GH3 de pituitaria en ratas (Yoo y Jeung, 2010), inhibe la neurotoxicidad inducida mediante ácido kaínico en hipocampo de ratón mediante la inhibición del mecanismo autofágico (Chang y cols., 2012), y atenúa la autofagia inducida con metanfetamina (Nopparat y cols., 2010).

En el presente trabajo los mecanismos de autofagia y apoptosis fueron significativamente inhibidos en los grupos de conejos que recibieron el tratamiento con melatonina de acuerdo con estudios en los que se describe la inhibición paralela de ambos procesos. Estos efectos del indol podrían ser la consecuencia de su acción antioxidante, la cual podría antagonizar directamente mecanismos que contribuyen tanto a la vía intrínseca como a la extrínseca de la apoptosis (Tuñón y cols., 2011a),

pero también podrían resultar en la inhibición del estrés del RE y, a su vez, dar lugar a una autofagia y apoptosis disminuidas.

5.3 Efecto de la melatonina sobre el estrés del RE y la apoptosis en el modelo de FHF inducido por el VRHD

Existe una evidencia creciente de que la apoptosis provocada por el estrés del RE se encuentra implicada en la patogénesis o exaltación de un gran número de enfermedades, convirtiéndola en una importante diana terapéutica. Sin embargo, muchos de los estudios realizados emplean sólo unos pocos agentes desencadenantes del estrés del RE y escasos tipos celulares, y por tanto, es esencial el estudio en modelos animales que permitan obtener resultados patofisiológicos relevantes. Por tanto, el modelo empleado en este trabajo mediante la infección con el VRHD constituye un modelo altamente reproducible de FHF y de considerable interés para investigar nuevas posibilidades terapéuticas dirigidas a atenuar el daño hepático y a mejorar la supervivencia en el FHF de etiología vírica. En este último protocolo experimental, se trató de profundizar en la última fase de la infección, previa a la muerte de los conejos por FHF, en los mecanismos del estrés del RE y de la muerte por apoptosis implicados en la patogénesis de una gran variedad de enfermedades hepáticas graves.

El estrés del RE activa a las chaperonas endógenas del RE: CHOP, BiP y los genes que codifican a la GRP94. La CHOP y la GPR94 son buenos marcadores de estrés del RE, ya que se expresan específicamente bajo condiciones de disfunción del RE (Zhang y Kaufman, 2008). Recientemente se ha demostrado que la BiP juega un papel central en la modulación de la sensibilidad y duración de la UPR (Gardner y Walter, 2011), por lo que el aumento de su expresión en el hígado es indicativo de que se produce el estrés del RE. Los datos recogidos en este estudio evidenciaron, a las 36 hpi, un aumento en la expresión de CHOP, BiP y GRP94 en el hígado de los conejos infectados con el VRHD, confirmando la inducción del estrés del RE en este modelo animal de FHF. El tratamiento con melatonina redujo la expresión de las tres chaperonas, lo que indica que la inhibición de la respuesta al estrés del RE puede desempeñar un papel en el efecto protector del indol. Nuestros resultados respaldan investigaciones previas en las que se indica que la mejora del daño hepático, por un inhibidor específico de la glucógeno sintasa quinasa 3 β en un modelo murino de FHF inducido mediante el tratamento con D-galactosamina (Chen y cols., 2012), o la coadministración de prostaglandina E1 con somatostatina después de una hepatectomía masiva en ratas, está asociado con una expresión reducida de CHOP (Jia y cols., 2013).

La vía de señalización activada por la interrupción de la homeostasis del RE, la UPR, ha sido relacionada con la apoptosis. Los avances en el campo han proporcionado

información sobre los mecanismos de regulación y sobre la interrelación entre las tres ramas de la UPR, iniciadas por los factores de estrés de la proteína quinasa PERK, IRE1α y ATF6. Con el fin caracterizar con mayor profundidad el efecto de la melatonina en la señalización del estrés del RE inducido por el VRHD, se investigaron los niveles de ARNm de los factores que intervienen en las tres vías de señalización de la UPR individualmente. Se observó tanto el aumento significativo en los niveles de ARNm de PERK, IRE1α, y ATF6, como la regulación positiva de los diferentes genes de respuesta al estrés del RE en las diferentes vías de la UPR en los animales infectados con el VRHD. Por lo tanto, los datos del estudio indican que las tres vías de la UPR y sus dianas son activadas en los conejos infectados con el VRHD. Los resultados obtenidos demuestran también que los efectos inducidos por el VRHD en las diferentes vías de señalización de la UPR se redujeron en los conejos tratados con melatonina, lo que sugiere que el indol podría constituir un potencial agente terapéutico.

En trabajos previos, nuestro grupo de investigación indicó que la infección con el VRHD induce la apoptosis, con aumento de la actividad y expresión de la caspasa 3 y el fragmento de 85 kDa que resulta de la proteólisis de la PARP-1, y la inhibición de los diferentes mecanismos que contribuyen tanto a la vía intrínseca como extrínseca de la apoptosis. Estos efectos fueron paliados mediante la administración de melatonina de forma dependiente de la dosis en los conejos infectados con el VRHD, lo que demuestra, por tanto, el papel protector del indol en el daño apoptótico en este modelo viral de FHF (Tuñón y cols., 2011a); resultados que coinciden con los obtenidos en estudios previos mediante el tratamiento con N-acetil cisteína en este modelo animal (San-Miguel y cols., 2006). Aunque los mecanismos exactos que median la apoptosis inducida por estrés del RE no se han esclarecido, la proteína quinasa JNK, el factor de transcripción CHOP y la actividad de la caspasa 12 han sido relacionados con la interconexión de ambas vías (Malhi y Kaufman, 2011).

La relación del estrés del RE y la apoptosis fue respalda en este estudio por los resultados obtenidos en la inmunofluorescencia doble de la CHOP y la caspasa 3, donde se observó la colocalización de ambas proteínas en las células hepáticas; además, los análisis de la JNK y la caspasa 12 reflejaron un aumento de la expresión hepática de ambos marcadores en los conejos infectados por el VRHD. En un estudio previo se demostró que la activación de JNK es esencial en la lesión hepática mediada por el VRHD (García-Lastra y cols., 2010). La activación de JNK es requerida para que se produzca la apoptosis inducida por el estrés del RE a través de al menos dos mecanismos: inducción de Fas y de la NADPH oxidasa 2 (NOX2) y el posterior estrés oxidativo (Li y cols., 2010). La caspasa 12, que normalmente se encuentra inactiva como procaspasa, se disocia de la membrana del RE, es escindida en un fragmento, y posteriormente se activa, iniciando así las vías de apoptosis (Yoneda y cols., 2001). Se sabe que la activación de la RE1 promueve, a través del reclutamiento del TRAF2, una

cascada de eventos de fosforilación que culmina con la activación de la JNK y de la caspasa 12 (Mosbah y cols., 2010; Malhi y Kaufman, 2011).

Gracias a estudios realizados en ratones deficientes para la CHOP, se ha conseguido establecer su papel en la apoptosis inducida por estrés del RE (Ji y cols., 2005). La supresión de Bcl-2, proteína que promueve la supervivencia celular, es uno de los mecanismos involucrados en mayor medida en la apoptosis inducida por la CHOP (McCullough y cols., 2001). Por otro lado, la oxidación del lumen del RE es inducida por el objetivo transcripcional de CHOP, la oxidasa 1 α del RE (ERO1 α), que promueve una hiperoxidación del medio que conduce a la muerte celular (Marciniak y cols., 2004).

En estudios previos se demostró que el tratamiento con melatonina produce una disminución del estrés oxidativo y aumenta la expresión del Bcl-2 en conejos infectados con el VRHD, lo que podría en parte ser debido a la inhibición que produce en la expresión de CHOP. El hecho de que la CHOP sea un objetivo transcripcional no sólo del ATF4, sino también de la XBP1 y del ATF6 (Tabas y Ron, 2011) proporciona un posible vínculo entre las tres vías para aumentar la intensidad de la respuesta de muerte celular en los animales infectados con el VRHD, y de su inhibición en los conejos tratados con la melatonina.

En resumen, la melatonina reduce el estrés del RE y la apoptosis en conejos infectados con el VRHD. Aunque serían necesarios estudios complementarios, los datos obtenidos sugieren que el efecto protector de la melatonina se debe no sólo a sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios y regenerativos, sino también a la atenuación del estrés del RE a través de la modulación de las tres vías de señalización de la UPR y a la inhibición parcial de la apoptosis. Estos hallazgos podrían contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas con el fin de proteger el hígado durante el síndrome del FHF.

CONCLUSIONES

Primera conclusión

La infección con el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo induce *in vivo* una rápida respuesta autofágica probablemente, bien con el objetivo de aumentar su replicación viral al igual que otros virus ARN positivos, como el virus de la hepatitis C y del Dengue emplean la autofagia como estrategia infectiva, o bien como mecanismo de defensa del hospedador con el propósito de proteger el hígado de los efectos nocivos del virus. Los resultados del estudio confirman el aumento en el número de estructuras autofágicas mediante microscopía electrónica de transmisión así como la localización inmunohistoquímica del antígeno LC3 y el incremento en la expresión hepática de los principales marcadores autofágicos tales como LC3-II, Beclina-1 y los componentes del complejo Atg12-Atg5-Atg16L1. Estos datos inequívocamente demuestran que la autofagia fue inducida durante los estadios tempranos de la infección en los conejos infectados con el virus.

Segunda conclusión

EL mecanismo autofágico inducido por el virus está asociado a la respuesta de estrés del retículo endoplasmático a través de la activación de la UPR durante los estadios tempranos de la infección. Los datos recogidos muestran unos niveles de expresión significativamente aumentados de BiP, CHOP y GRP94, principales chaperonas del retículo endoplasmático, a las 24 hpi en paralelo al aumento de la expresión de Beclina-1 y de los componentes de los dos sistemas tipo ubiquitina, Atg12-Atg5-Atg16L1 y LC3. Sin embargo, en los últimos periodos de la infección, 30 y 36 hpi, mientras que la autofagia comienza a declinar, la proteólisis de PARP-1, y la actividad de la caspasa 3 aumentan, desencandenándose la apoptosis como mecanismo de muerte celular inminente a la rápida infectividad del virus.

Tercera conclusión

La melatonina induce una disminución en la autofagia asociada a la infección con el virus de le enfermedad hemorrágica del conejo e inhibe la replicación del ARN viral. Los resultados indicaron tanto una reducción en la inmunorreactividad del antígeno VP60 como en la expresión relativa del ARNm de la proteína viral mayoritaria de la cápside, así como una disminución en la expresión de los principales marcadores autofágicos.

Cuarta conclusión

En los datos recogidos del estudio la melatonina redujo significativamente la expresión de las principales chaperonas del retículo endoplasmático desde los primeros periodos infectivos, mientras que en los marcadores apoptóticos estos efectos no se observaron hasta los últimos estadios de la infección. Dada la importancia e implicación observada de ambas vías en la autofagia inducida mediante el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo, los efectos beneficiosos de la melatonina podrían contribuir al desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas con el propósito de proteger el hígado del daño producido por el fallo hepático fulminante humano.

Conclusión final

El virus de la enfermedad hemorrágica del conejo induce una respuesta autofágica incompleta durante los primeros estadios de la infección asociada al desarrollo de las vías de señalización del estrés del retículo endoplasmático y apoptosis. Además, a medida que avanza el tiempo postinfección, la autofagia disminuye y los principales marcadores apoptóticos aumentan, probablemente como mecanismo de defensa del hospedador. Los resultados obtenidos confirman el papel protector de la melatonina frente al daño hepático asociado a la replicación viral, estrés oxidativo, estrés del retículo endoplasmático, apoptosis y autofagia producido por el virus.

Dado que el fallo hepático fulminante está asociado con una alta mortalidad y que el trasplante hepático no siempre es posible en el momento adecuado, la inhibición del estrés del retículo endoplasmático, de la apoptosis, así como la reducción de la replicación viral y de la respuesta autofágica, podrían ser dianas moleculares del uso terapéutico de la melatonina en el fallo hepático fulminante constituyendo un soporte temporal en espera de un trasplante o de una recuperación espontánea.

7 SUMMARY

7.1 Introduction and objectives

Fulminant hepatic failure (FHF) is a clinical syndrome associated with a high mortality (60-90%), in which there is an acute damage in a patient without a known pre-existing liver disease that leads to a rapid loss of liver function, characterized mainly by hepatic encephalopathy, metabolic derangement, jaundice and coagulopathy (Trey and Davidson, 1970; O'Grady *et al.*, 1993). There are many causes of FHF, which vary with geographic region. The most frequent causes worldwide include viral hepatitis, particularly hepatitis A (HAV) and B (HBV), medication overdose, idiosyncratic drug reactions, ingestion of toxins and metabolic disturbances. In addition to these known etiologies, indeterminate causes account for a large proportion of cases of FHF (Ichai and Samuel, 2011). However, in recent years diagnosis has greatly improved, decreasing the cases of undetermined etiology (Germani *et al.*, 2012).

Knowledge concerning the pathophysiological basis and the pathogenic mechanisms of the FHF hemodynamic alterations, immunological dysfunction, and multiorgan failure is still very rudimentary. It is therefore crucial to investigate the molecular basis of FHF in more depth (Jalan, 2005). Furthermore, although many FHF treatment options have been proposed and applied in recent years, only liver transplantation has been shown to be the most effective therapy, but the procedure is limited by shortage of donor organs combined with other technical and treatment difficulties, meaning that the hepatic transplantation is not always an option.

For these reasons, other therapeutic options have to be considered. Artificial and bioartificial liver support systems or cell-based therapies are increasingly the focus of attention (Bilir *et al.*, 2000; Strom and Fisher, 2003; Nussler *et al.*, 2006). These systems alone have no significant effect on patient survival and are only regarded as useful approach to bridge patients with FHF to liver transplantation. As a result, reproducible experimental animal models resembling FHF clinical conditions are absolutely crucial to improve our insight into the metabolic and physiological derangements of FHF and to facilitate the development of new therapeutic modalities. Extensive research has been performed to develop suitable models of FHF, including surgical techniques and hepatoxic drugs. Moreover, viral hepatitis remains an important cause of FHF in many parts of the world, but the use of infective agents to induce it experimentally have so far had very limited success (Tuñón *et al.*, 2007).

Our research group has described a new animal model of FHF using experimental infection of rabbits with the rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) (Tuñón *et al.*, 2003). The RHDV, a member of the *Caliciviridae* family, causes an acute, highly fatal disease, first reported in China two decades ago (Liu *et al.*, 1984). Rabbit hemorrhagic disease (RHD) is a viral hepatitis which displays surprising clinical, anatomopathological and transmission mode similarities to fulminant human viral

hepatitis B, C, and E (Mikami et al., 1999). The virus does not replicate in any other vertebrates (Gould et al., 1997) and to date there is no indication that it can be transmitted to humans, even among those populations most exposed to the virus. It has been shown that the viral antigen can already be found in hepatocytes at 12 hr post-infection (pi) and that at 36 and 48 hpi, it is localised in 60-80% of hepatocytes (Prieto et al., 2000). RHD is characterized by a high morbidity and a mortality rate that approaches 90% (Alonso et al., 1998; Tuñón et al., 2003). Rabbits die within 36 to 54 hpi with clinical signs characteristic of progressive FHF and coma. In addition, the interval between infection and death in the majority of animals provides a wide therapeutic window which indicates that our model complies with another of the essential prerequisites of a good FHF animal model, that is, the existence of a sufficiently prolonged interval between intervention and death to enable research into various treatment methods or liver support technologies. Moreover, the use of a medium-sized animal facilitates serial collection of blood samples, and makes easier monitoring of intracranial pressure and biochemical alterations produced during the infection course (Tuñón et al., 2003). Thus, this model reproduces representative biochemical and histological parameters and clinical signs of human FHF.

Moreover, we have previously reported that during experimental RHDVinfection the expression of genes involved in different injury, apoptosis and regeneration molecular pathways change significantly in late infective periods (San-Miguel *et al.*, 2006; García-Lastra *et al.*, 2010), however, the mechanism of infection and viral replication had not been studied meticulously. The accurate pathogenic mechanisms that lead to the fatal ending of this pathology are still unknown, and, otherwise, new therapeutic options that at least increase the survival of patients waiting for a possible liver transplant, are still necessary.

The autophagy pathway is a bulk degradation system which controls the clearance and recycling of intracellular constituents for the maintenance of cellular survival (Deretic and Levine, 2009) and it can participate in the host response to infection (Dreux and Chisari, 2010) with the aim of eliminate intracellular pathogens. Autophagy primarily fulfills a pro-survival role during adaptation to unfavourable growth conditions or following cellular stress. The autophagic process begins with the formation of an isolation membrane called phagophore that involves a small portion of cytoplasm forming the autophagosome, an intermediate double membrane vesicle which contains the bulk degradation charge previously selected for its degradation. Once the autophagosome is formed it fuses with the lysosome to form an autolysosome where lysosomal proteases act together with membrane transporters with the aim to expel the degradation products to the cytoplasm. In addition to its cellular homeostasis function, autophagy contributes to the immune host defense against diverse infections. To counteract this mechanism, many patogens have evolved to evade, subvert or exploit autophagy in their own benefit (Dreux *et al.*, 2009). The

inhibition of the autophagic mechanism results in an increased replication of virulence of different viruses such as herpes simplex virus 1 (HSV-1) or vesicular stomatitis virus (VSV) (Maier and Britton, 2012). However, many viruses do not impede degradation but instead promote the generation of degradative autolysosomes, which are the endpoint compartments of autophagy. Dengue virus (DENV), poliovirus, and hepatitis C virus (HCV), all positive-strand RNA viruses as RHDV, utilize the maturation of autophagosomes to promote their replication and viral release. While the benefits that each virus obtains from their interaction with the host autophagic proteins are unique, the similarity between these viruses indicates a complex relationship between cytosolic viruses and host cell degradation vesicles (Blanchet *et al.*, 2010; Crawford *et al.*, 2012; Richards and Jackson, 2013).

The endoplasmic reticulum (ER) is a cellular organelle essential for cell function and survival. Conditions that interfere with ER function lead to the activation of the unfolded protein response (UPR), a homeostatic signaling network that orchestrates the recovery of ER function, and a failure to adapt to ER stress results in apoptosis (Gorman et al., 2012) contributing to the FHF physiopathology. Therefore, interventions aimed to attenuate ER stress may contribute to reduction in apoptotic cell death (Crespo et al., 2012). Different models of FHF have revealed a hepatocytes massive death by apoptosis, which is the first cellular response to principal injuries. ER stress, that is one of the typical stress responses initiated in cells after viral infection, is important in the maintenance of the healthy cells physiology and functions to downregulate protein synthesis through the UPR (Crespo et al., 2012). It has been reported that autophagy is activated upon ER stress as a defensive mechanism for survival (Ogata et al., 2006), and it is known that some viruses stimulate signaling pathways from UPR to autophagy (Shinohara et al., 2013). Interference of the autophagic response with cell death mechanisms plays an important role in determining the fate of infected cells, and recent data suggest the existence of a cross-talk between autophagic and apoptotic pathways (Tovilovic et al., 2014). For example some studies have demonstrated that the autophagy process can contribute to the death of virusinfected cells through apoptotic mechanisms (Xi et al., 2013). However, the autophagydependent modulation of cell death is a complex phenomenon and it has also been reported that autophagy can prolong the survival of virus-infected cells by counteracting the apoptotic response (Joubert *et al.*, 2012; Tovilovic *et al.*, 2013).

Melatonin is the principal secretory product of the pineal gland (Lerner *et al.*, 1958) which is produced in many tissues including retina and the gastrointestinal tract. It plays a fundamental role in the neuroinmmune-endocrine system, but is also a potent antioxidant and a free radical scavenger (Antolín *et al.*, 1996; Reiter *et al.*, 2000; Calvo *et al.*, 2013). Different therapeutic strategies focused on the inhibition of cell death in FHF have been investigated, but most of the described targets exert a pleiotropic role that might interfere not only with the cell death but also with survival

pathways (Bantel and Schulze-Osthoff, 2012). It has been demonstrated that melatonin administration prevents alcoholic injury (Hu *et al.*, 2009) or D-galactosamine/lipopolysaccharide administration (Wang *et al.*, 2007). The beneficial actions of melatonin in the management of viral infections, which are often associated with inflammatory injury and increased in oxidative stress, are likely related to its ability to limit the negative molecular processes normally activated when viruses invade cells (Boga *et al.*, 2012). It is also known that in an animal model of FHF of viral origin induced by infection with the RHDV melatonin not only inhibits apoptosis in a dose-dependent manner (Tuñón *et al.*, 2011a), but also reduces inflammation and enhances liver regeneration (Laliena *et al.*, 2012) providing evidence that melatonin might have some clinical application in the management of patients with FHF.

Thus, according with the previous indications and with the aim of clarify the RHDV interaction mechanism and its relationship with the host autophagic proteins, the main objective of this study has been elucidate the RHDV-infection effects on the molecular mechanisms that participate in the autophagic response and further comprehend the connections between these processes and the ER stress and apoptosis signaling pathways in the virus pathogenesis context as an animal model of human FHF.

Moreover, the second objective of the present study has been clarify the possible protective effect of melatonin administration in RHDV-infected rabbits. Thus, we have studied the indol effects on viral replication and diverse involved mechanisms, as well as its relation with the RHDV-induced ER stress and apoptosis. Ultimately, we have confirmed the melatonin effects delving on the study of the ER stress and apoptosis molecular pathways in the animal model of FHF of viral etiology previously described.

7.2 Materials and methods

7.2.1 Virus and experimental model

Nine-week-old male New Zealand white rabbits were kept in the animal facility of the University of León with 12-hr light cycle at 21-22°C and 50% relative humidity. They were given a standard dry rabbit food and water ad libitum. Rabbits were injected intramuscularly with 2x10⁴ hemagglutination units of the RHDV isolate AST/89. We have previously reported that during experimental RHDV infection biochemical data and the expression of genes involved in injury and regeneration change remarkably at 36-48 hpi, with a 10-15% survival rate at 48 hpi (Tuñón et al., 2003; García-Lastra et al., 2010; Tuñón et al., 2011b). However, the infectivity and RHDV replication mechanism had not been studied in depth from the first infective periods. Thus, in the first experimental protocol we decided to study the effects of RHDV-infection on viral replication and its relationship with the autophagic process; moreover, the RHDV effect on different molecular mechanisms where the components of autophagic machinery participate and its connection with the apoptosis and ER stress signaling pathways was elucidated. We employed 36 rabbits, 30 of them were injected with the RHDV isolate in 300 μ l of saline solution at 21:00 hr and sacrificed at 12, 18, 24, 30 and 36 hpi. The rabbits were divided in six groups: Control group (n=6) received 300 μ l of saline solution, and RHDV-infected groups of rabbits sacrificed at 12, 18, 24, 30 and 36 hpi (n=6 each). The experimental groups used in the first experimental protocol are summarized below:

- Group of control rabbits: Control
- Group of RHDV-infected rabbits sacrified at 12 hpi: RHDV12
- Group of RHDV-infected rabbits sacrified at 18 hpi: RHDV18
- Group of RHDV-infected rabbits sacrified at 24 hpi: RHDV24
- Group of RHDV-infected rabbits sacrified at 30 hpi: RHDV30
- Group of RHDV-infected rabbits sacrified at 36 hpi: RHDV36

Once confirmed that RHDV-infection induces a rapid autophagic response by the observation of values significantly increased of the main autophagic markers in infected animals, we decided to investigate if the protective effect of melatonin against the hepatic injury induced by the RHDV may be associated with the modulation of the autophagic response. For this second experimental protocol, the effects of melatonin were studied during the evolution of the disease at different infection stages comparing these results with the observed in rabbits without the melatonin administration. We employed 36 rabbits: 32 rabbits were injected intramuscularly with $2x10^4$ hemagglutination units of the RHDV isolate AST/89 in 300 µl of saline solution at

21:00 hr, and 4 rabbits that received vehicle injections as a Control group. The effects of melatonin administration were analyzed by sacrificing Control rabbits (n=4) and batches of infected animals at 18, 24, 30 and 36 hpi (n=4 each). Melatonin was given (20 mg/kg body weight i.p.) at 0, 12 and 24 hpi; untreated animals received 4 ml of vehicle at 0, 12 and 24 hpi. Melatonin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was dissolved into absolute ethanol and further dilutions were made in saline solution. The final concentration of ethanol was 5%. The experimental groups used in this second experimental protocol are summarized below:

- Group of control rabbits: Control
- Group of RHDV-infected rabbits sacrified at 18 hpi: RHDV18
- Group of RHDV-infected rabbits treated with melatonin and sacrified at 18 hpi: RHDV18+Mel
- Group of RHDV-infected rabbits sacrified at 24 hpi: RHDV24
- Group of RHDV-infected rabbits treated with melatonin and sacrified at 24 hpi: RHDV24+Mel
- Group of RHDV-infected rabbits sacrified at 30 hpi: RHDV30
- Group of RHDV-infected rabbits treated with melatonin and sacrified at 30 hpi: RHDV30+Mel
- Group of RHDV-infected rabbits sacrified at 36 hpi: RHDV36
- Group of RHDV-infected rabbits treated with melatonin and sacrified at 18 hpi: RHDV36+Mel

Data collected showed that melatonin is able to reduce the autophagy related to RHDV-infection and to inhibit the viral RNA replication from the early post-infection periods. Therefore, in order to delve deeper into the beneficial and therapeutic effects of melatonin on the ER stress induced by RHDV-infection we decided to study the RHDV effects just at 36 hpi, because it is the infective period in which the virus is fully extended by the hepatocytes and during which the most significant changes in the expression of genes involved in liver regeneration and damage occur (García-Lastra *et al.*, 2010; Laliena *et al.*, 2012). Accordingly, at first we investigated the molecular mechanisms involved in the ER stress signaling pathway thorugh the UPR. Once elucidated, the possible protective effects of the melatonin administration in the RHDV-infected rabbits were studied, furthermore, we determined if melatonin effects were dose-dependent. For this third experimental protocol 30 rabbits were employed: 18 rabbits were injected intramuscularly with $2x10^4$ hemagglutination units of the RHDV isolate AST/89 in 300 µl of saline solution at 21:00 hr, and 12 rabbits were used as an uninfected control. Rabbits were divided into five groups: Control group received

4 ml of vehicle at 0, 12 and 24 hpi. Control+Mel group received 20 mg/kg body weight i.p. at 0, 12 and 24 hpi. RHDV group received 4 ml of vehicle at 0, 12, and 24 hpi. RHDV+Mel10 group received 10 mg/kg body weight i.p. at 0, 12, 24 hpi. RHDV+Mel20 group received 20 mg/kg body weight i.p. at 0, 12, and 24 hpi. Melatonin (Sigma-Aldrich) was dissolved into absolute ehanol, and further dilutions were made in saline solution. The final concentration of ethanol was 5%. The experimental groups used in this third experimental protocol are summarized below:

- Group of control rabbits: Control
- Group of control rabbits that received a melatonin dose of 20 mg/kg weight: Control+Mel
- Group of RHDV-infected rabbits: RHDV
- Group of RHDV-infected rabbits treated with a melatonin dose of 10 mg/kg weight: RHDV+Mel10
- Group of RHDV-infected rabbits treated with a melatonin dose of 20 mg/kg weight: RHDV+Mel20

The present study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health, and it was specifically approved by the Ethics Committee of the University of León.

7.2.2 Samples collection

Animals were sacrificed at different times for each of three experimental protocols with an intravenous injection of sodium pentobarbital and necropsy was performed immediately. The liver was weighed, minced and washed in cold saline and it was frozen by immersion in liquid nitrogen and stored at -80°C for molecular determinations.

7.2.3 Measurement of reduced and oxidised glutathione

Oxidised and reduced glutathione (GSSG and GSH, respectively) analysis was performed by the method of Hissin and Hilf (1976). Briefly, 250 mg of tissue was homogenised in 0.1 M sodium phosphate 5 mM EDTA buffer (pH 8.0) with 25% phosphoric acid at a proportion of 1:20. The total homogenate was centrifuged at 100,000 g at 4°C for 30 minutes to obtain the supernatant for the assay of GSH and GSSG.

GSH assay: To 0.5 ml of the 100,000 g supernatant, 4.5 ml of the phosphate-EDTA buffer, pH 8.0, was added. The final assay mixture (2.0 ml) contained 100 μ l of the diluted tissue supernatant, 1.8 ml of phosphate-EDTA buffer, and 100 μ l of the *o*phthalaldehyde solution (7.5 μ M). After mixing and incubating at room temperature for 15 min, the solution was transferred to a quartz cuvette. Fluorescence at 420 nm was determined with the activation at 350 nm. Phosphate-EDTA buffer was used as a blank. Calculation of the concentrations was performed with an increasing GSH solutions pattern from 0.81 to 32.54 nM.

GSSG assay: A 0.5-ml portion of the original 100,000 g supernatant was incubated at room temperature with 200 μ l of 0.04 M N-ethylmaleimide for 30 min to interact with GSH present in the tissue. To this mixture, 4.3 ml of 0.1 N NaOH was added. A 100- μ l portion of this mixture was taken for measurement of GSSG, using the procedure outlined above for GSH assay, except that 0.1 N NaOH was employed as a blank rather than phosphate-EDTA buffer. Calculation of the concentrations was performed with an increasing GSSG solutions pattern from 0.33 to 1.63 mM.

7.2.4 Western blot analysis

Western blot (Laemmli, 1970) assay were performed on nuclear extracts and total homogenates.

For total homogenates liver tissue (25 mg) was homogenised in RIPA buffer (1 ml) containing protease and phosphatase inhibitor cocktails (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Further disrupt and homogenize tissue with a manual homogenizer, maintaining temperature at 4°C throughout all procedures. Then the homogenate was incubated on ice for 30 min and finally the samples were centrifuged at 13,000 g for 30 min at 4°C. The supernatant fraction was recollected and stored at - 80°C in aliquots until use.

Nuclear extracts were prepared from liver homogenates. Briefly, 100 mg of liver from all animals was homogenized in 5×10^{-4} l of buffer A (0.01 M HEPES-KOH pH 7.9, 250 g/l glycerol, 0.420 M NaCl, 0.0015 M MgCl₂, 2×10^{-4} M EDTA, 5×10^{-4} M DTT, 2×10^{-4} M PMSF) and a phosphatase inhibitor cocktail (Roche Diagnostics GmbH) to disrupt extracellular matrix and cellular membranes. Homogenates were centrifuged at 1,000 g for 10 min at 4°C. The pellet was resuspended in 2.5 x 10⁻⁴ l of buffer B (0.02 M NaCl HEPES-KOH pH 7.9, 250 g/l glycerol, 0.042 M NaCl, 15 x 10⁻⁴ M PMSF), homogenized, and incubated at 4°C for 30 min. Cellular debris was removed by centrifugation at 14,000 g for 15 min at 4°C. The supernatant fraction containing DNA binding proteins was recollected and stored at -80°C in aliquots until use.

Protein concentration was measured by Bradford assay (Bradford, 1976). Equal amounts of protein extracts (30-50 μ g) were separated by 7-15% sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred electrically to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). The membranes were then blocked with 5% non-fat dry milk in Phosphate-Buffered Saline (PBS) containing 0.05% Tween 20 (TPBS) for 30 min at 37°C and probed overnight at 4°C with polyclonal anti-B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL), Poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1), sequestosome-1 (p62/SQSTM1), CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP), activating transcription factor (ATF)6, protein kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase (PERK), phospho-(PERK), spliced form of X-box binding protein-1 (XBP1s) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); c-Jun N-terminal kinase (JNK), phospho-(JNK) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); immunoglobulin-heavy-chain binding protein (BiP), phospho-inositol-requiring enzyme 1 p-(IRE1), caspase 12, microtubuleassociated protein 1 light chain 3 (LC3)I/II, mammalian target of rapamycin (mTOR), phospho-(mTOR) (Abcam, Cambridge, UK) antibodies at 1:200-1:1,000 dilution with TPBS containing 2.5% non-fat dry milk. Equal loading of protein was demonstrated by probing the membranes with a rabbit anti-β-Actin, anti-GAPDH (1:2,000; Sigma-Aldrich) y anti-Lamin- β (1:200; Santa Cruz Biotechnology) polyclonal antibody. After washing with TPBS, the membranes were incubated for 1 hr at room temperature with secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody (Dako, Glostrup, Denmark), at 1:5,000 dilution and visualized using a detection commercial kit (Luminol Reagent, Santa Cruz Biotechnology) and exposing the membrane to photographic films (Amersham Hyperfilm ECL, Amersham, Little Chalfont, UK). The density of the specific bands was quantified with an imaging densitometer (Scion Image J Software 1.46a, Bethesda, MD, USA).

7.2.5 Transmission Electron Microscopy

For transmission electron microscopy (TEM) analysis, liver tissues were dissected into 1-mm³ pieces for good penetration of the fixative, and then immersed in a modified Karnovsky fixative (2% glutaraldehyde + 4% buffered formalin (0.1 mol/l phosphate buffer)) overnight. The samples were post-fixed in 2% osmium tetroxide for 2 h at 4°C and dehydrated with ascending grades of alcohol. The tissue block was then infiltrated and embedded in epon resin at 60°C for 72 hr. Ultrathin sections (70 nm) were cut with an automatic ultra-microtome (Reichert Ultracut E, Vienna, Austria) using a diamond knife. The sections were collected on copper grids (200 meshes) and stained with uranyl acetate and lead citrate solutions. TEM images were observed under a transmission electron microscope (JEOL LTD, Tokyo, Japan) operating at an accelerating voltage of 80 kV.

7.2.6 Real-time RT-PCR

Total RNA was obtained by using a Trizol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and quantified using Nanodrop1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Residual genomic DNA was removed by incubating RNA with RQ1 RNase-free DNase (Promega, Madison, WI, USA). RNA integrity was confirmed by formaldehyde gel electrophoresis. Total RNA (1 µg) was reverse transcribed as described (Crespo et al., 2010). First-standard cDNA was synthesized using High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The negative control (no transcriptase control) was performed in parallel. Real-time PCR was performed under optimal condition using the following PCR amplification mixture (20 µl total): 2x FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche Diagnostics GmbH) and 15 μ M forward and reverse primers. The sets of PCR primers used for the analysis of the mRNA abundance are specified in Table 3. Each assay included a no-template control and an RT negative control. Relative changes in gene expression levels were determined using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$. The cycle number at which the transcripts were detectable (Ct) was normalized to the cycle number of β -Actin gene detection, referred to as ΛCt .

7.2.7 Immunohistochemistry

Tissue samples were recovered, fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Sections (4 µm) were dewaxed and hydrated through graded ethanol, cooked in 25 mM citrate buffer, pH 6.0, in a pressure cooker for 10 min, transferred into boiling deionized water and let to cool for 20 min. Tissue sections were then treated with 3% hydrogen peroxide to inactivate endogenous peroxidase activity. The slides were incubated with rabbit anti-CHOP, anti-VP60, and anti-LC3 antibodies (Santa Cruz Biotechnology; Ingenasa, Madrid, Spain; and Abcam, respectively) overnight at 4°C. Subsequently, the sections were incubated for 30 min using the EnVision+ system and developed with a solution of 3-3-diaminobenzidine (Vector Lab, Burlingame, CA, USA). The slides were stained with hematoxylin for 10 s and mounted. The specificity of the technique was evaluated by negative controls (omitting the incubation with the primary antibody and incubating it with non-immune sera). Pathological findings were assessed by one of the authors blinded to the group allocations.

7.2.8 Double immunofluorescence

For immunofluorescent double staining sections were dewaxed in xylene and rehydrated in graded ethanol to distilled water, do not allowing slides to dry at any time during this process. Heat mediated antigen was performed in a cooker filled with

1 mM EDTA (pH 8.0). Sections were brought to a boil and then maintain at a subboiling temperature for 15 min. All subsequent incubations with immunochemicals were performed in a humidified chamber. After unmasking and after blocking the nonspecific binding the sections were co-incubated overnight at 4°C with the CHOP (Abcam) and cleaved caspase 3 (Cell Signaling Technology) antibodies at 1:100 and 1:300 dilution, respectively; and with the LAMP-1 antibody (Santa Cruz Biotechnology) and LC3 (Abcam) at 1:50 and 1:200 respectively. After incubation with primary antibodies, samples were washed twice in PBS for 10 min at room temperature. Thereafter, in the double immunofluorescence for CHOP and cleaved caspase 3, the secondary antibodies donkey anti-rabbit conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) or donkey anti-mouse conjugated with Texas Red (Jackson ImmunoResearch, Baltimore, PA, USA) were applied for 2 hr at 21°C. Moreover, concerning the double immunofluoresce for LAMP-1 and LC3, the secondary antibodies donkey anti-rabbit conjugated with FITC or donkey anti-mouse conjugated with Dylight[™]539 (Jackson ImmunoResearch) were also applied for 2 hr at 21°C. After washing in Tris-Buffered Saline (TBS), the coverslips were mounted on Dako Cytomation Fluorescent Mounting Medium (Dako). In sections from each experimental group, the primary antibody was replaced by antibody diluent to assess for non-specific binding of the secondary antibody. The preparations were analyzed with an inverted fluorescent microscope (Nikon Eclipse Ti, Nikon, Chiyoda, Tokyo, Japan).

7.2.9 Caspase 3 activity

Lysates were prepared by homogenizing liver tissue in 0.25 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris and a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics GmbH). The lysates were then centrifuged at 14,000 g for 10 min at 4°C, and supernatants containing 50 μ g of protein were incubated for 1 hr at 37°C in HEPES buffer containing 100 μ M concentrations of the specific fluorogenic substrate 7-amino-4-methylcoumarin N-acetyl-L-aspartyl-Lglutamyl-L-valyl-l-aspartic acid amide (DEVD-AMC). Cleavage of the caspase substrate was monitored using the Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Bio-Tek) at excitation/emission wavelengths of 380/460 nm. Activity was expressed as fluorescence units per milligram of protein per minute of incubation.

7.2.10 Statistical analysis

Results are expressed as mean values ± standard error of the mean (SEM). Data were compared by analysis of variance (ANOVA); when the analysis indicated the presence of a significant difference, the means were compared with the Newman-

Keul's test. Significance was accepted when p was less than 0.05. Values were analyzed using the statistical package SPSS 19.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

7.3 Results

7.3.1 Effects of RHDV on autophagic response

7.3.1.1 Expression of the viral capsid protein VP60

The RHDV is a single positive stranded RNA virus with a 40 nm icosaedric capsid composed by 90 dimers of the capsid protein VP60, and a minor structural protein VP2 which regulates capsid protein levels (Chen *et al.*, 2009). The expression level of the VP2 protein is very low and has been estimated to be one-fifth of that of VP60 (Meyers, 2003); therefore, to determine the presence of the virus in infected hepatocytes we employed VP60 mRNA as a viral marker and its expression was analyzed in liver extracts by quantitative RT-PCR (Figure 31). The relative VP60 mRNA expression was detected at 18 hpi, and increased significantly after 24 hpi in RHDV-infected rabbits. Viral VP60 antigen was also examined by immunohistochemical techniques (Figure 32). Labelling was not found either in rabbits from Control group nor in infected in hepatocytes from animals killed at 12 hpi. Viral VP60 antigen was first detected in hepatocytes from animals killed at 18 hpi. The extent of labelling increased markedly at 24 hpi (+25%) with the labelled hepatocytes mainly found in the periportal area. At 30 and 36 hpi, the liver revealed extensive viral VP60 antigen immunolabelling compared to the Control group (+60% and +90%, respectively).

7.3.1.2 Detection of autophagic vesicles in RHDV-infected hepatocytes by transmission electron microscopy

With the aim of proving the effect of RHDV on the autophagic response a variety of analysis were carried out. One standard method to monitor autophagy is TEM, which, together with immunohistochemical localization of LC3, enables the detection of autophagosomes. The TEM examination in this study reveals a normal morphology in the hepatocytes of the Control group, and an increase in different autophagic structures in liver cells starting at 12 hpi (Figure 33). Phagophore structure, double-membrane autophagosomes with engulfed damaged organelles, and autolysosomes with a large vacuole containing large amount of cellular debris were present at 18 and 24 hpi. Moreover, early disease periods showed increased levels of lysosomes and mitochondria as well as an augmentation of their density. Images revealed a great number of autophagic vacuoles (black arrows) in different stages. Severe cytoplasmic biliary necrosis was observed in the periportal rather than centrilobular hepatocytes, characterized by the accumulation of electron-dense biliary materials and a markedly increase in the number of lysosomes. The bile canalicular microvilli were very swollen and stunted. In more advanced disease periods, 30 and 36 hpi, the chromatin was condensed and aggregated at the periphery of the nuclear membrane, and hepatocytes showed vacuolization of the cytoplasm (black arrows), which is a typical sign of apoptosis (Figure 33).

7.3.1.3 Effects of RHDV-infection on diverse autophagic markers

Monitoring static levels of autophagosomes is not sufficient to elucidate the effects of RHDV on autophagy, because an accumulation of autophagosomes in cells could result from either, an increase in the rate of their formation, or a decrease in their fusion with lysosomes (Mizushima *et al.*, 2010). Thus, to examine autophagy in RHDV-infected rabbits and to avoid misinterpretation, a combination of different autophagy markers by immunohistochemical techniques, Western blot, and RT-PCR analysis was performed.

There is an ubiquitin-like system essential for the autophagosomes formation which is formed by the Atg12-Atg5-Atg16L1 complex and located in the outer layer of the isolation membrane (Fukuda and Itoh, 2008).

To confirm that RHDV-infection triggers autophagy we quantified mRNA expression of the complex components at different infection periods. Results indicated that mRNA levels increased from 12 hpi for Atg12 and Atg5 (Atg12: +73%, Atg5: +25%), and from 18 hpi for Atg16L1, showing a maximum value at 18 hpi in the mRNA levels of all the complex components (Atg16L1: +123%, Atg12: 196%, Atg5: +63%); values still remained elevated at 24 hpi (Atg16L1: +40%, Atg12: +77%, Atg5: +39%) and reached basal levels or even lower at 30 and 36 hpi (Figure 34).

The beclin-1-phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) complex is a critical element in the autophagy signaling pathway (Wirawan *et al.*, 2012). We observed that beclin-1 mRNA levels increased at 18 (+103%) and 24 hpi (+153%) with a decrease in later periods to Control group values (Figure 35) in parallel to the changes detected in the ubiquitine-like system Atg12-Atg5-Atg16L1 (Figure 34).

Beclin-1-PI3K-mediated autophagy is positively regulated by UV radiation resistance associated gene (UVRAG), which interacts with beclin-1 in the early steps of the process leading to the activation of autophagy through the maturation of the autophagosomes (Zhao *et al.*, 2012). UVRAG mRNA expression revealed a peak at 18 hpi (+127%) corresponding to the observed changes in beclin-1 mRNA expression, and then began to decrease (Figure 36).

In addition to the Atg12-Atg5-Atg16L1 system, there is a second ubiquitine-like system which is also essential in the autophagosome formation and is formed by LC3 and phosphatidylethanolamine (PE). LC3 is a major marker of the autophagosome formation and a protein widely used as a hallmark of autophagy (Wang *et al.*, 2013b). As shown in Figure 37, immunoreactivity for LC3 was negative in liver sections from

Control rabbits. LC3 antigen was detected in hepatocytes at 12 hpi (+90%). At 18 hpi LC3 immunolabelling increased significantly (+198%), reaching a peak at 24 hpi (+207%). However, at most advanced infection periods, 30 and 36 hpi, the hepatic sections revealed a decrease in the number of labelled hepatocytes without significant changes compared to Control group (+10% and +2%, respectively).

Stressors, such as some viruses, upregulate LC3 expression and promote the binding of cytosolic LC3-I to PE to form the autophagosome-specific lipidated form LC3-II, which remains attached to the inner membrane making it a good marker of autophagosomes. Thus, the conversion of LC3-I to LC3-II is a certain and specific marker of autophagy and necessary for the autophagosome formation (Deretic and Levine, 2009). When liver homogenates were analyzed by Western blot to detect the different forms of LC3, a significant increase in protein expression of LC3-II was observed at 18 (+260%) and 24 hpi (+250%), with a later decrease at 30 (+70%) and 36 hpi (+10%) (Figure 38).

Results from TEM studies, LC3 hepatocyte labelling and LC3-II protein expression unequivocally demonstrate that the autophagy was induced in RHDV-infected rabbits from early infection periods.

We further studied by RT-PCR and Western Blot the specific autophagy substrate p62/SQSTM1, an adaptor protein which plays an essential role in mediating selective autophagy and serves as an autophagy receptor targeting ubiquitin proteins to autophagosomes for degradation (Pankiv *et al.*, 2007). p62/SQSTM1 mRNA expression increased from 12 hpi, and turned significant at 18 hpi (+92%), reaching a maximum value at 24 hpi (+102%). We observed a reduction in its values at 30 (-14%) and 36 hpi (-31%) (Figure 39). These changes resulted in an increase of p62/SQSTM1 protein expression at 18 and 24 hpi and in a decrease of the values in later infection periods (Figure 40). These data may reflect an incomplete autophagy with impairment of the autophagic flux.

One of the major pathways regulating autophagy involves mTOR. It is known that activation of mTOR in nutrient-proficient cells acts as a negative regulator of autophagy, while repression of mTOR by nutrient deprivation or rapamycin treatment induces autophagy (Jung *et al.*, 2010). However, the cross-talk between mTOR pathway and autophagy induction during viral infection is complex, and it has been reported that some viruses activate mTOR signaling (Shrivastava *et al.*, 2012; Tovilovic *et al.*, 2014). We analyzed the hepatic expression of p-mTOR by Western blot at different RHDV-infection periods (Figure 41). A progressive increase in the hepatic expression of p-mTOR was observed at 12 (+75%), 18 (+100%), and 24 hpi (+125%) in RHDV-infected animals. However, at 30 hpi p-mTOR hepatic level decreased to values below the control group (-47%), and it was undetectable at 36 hpi.

7.3.1.4 Significance of ER stress in RHDV-induced autophagy

Although the role of autophagy in normal ER function is not established, there are different studies that have shown that autophagy is associated with the ER and maybe an important part of normal ER function (Ogata *et al.*, 2006).

Induced autophagy through the activation of the ER stress pathways plays a key role in the maintenance of cellular homeostasis reducing the accumulation of unfolded proteins in the ER lumen. This autophagic process could be used as an alternative mechanism of degradation. During ER stress, different transcription factors regulate the expression of ER chaperones that enhance the folding capacity of the ER, including CHOP, BiP/GRP78 and glucose-regulated protein 94 (GRP94).

BiP is an ER chaperone protein which is required for protein folding and has been recently shown to play a central role modulating the sensitivity and duration of the UPR (Gardner and Walter, 2011). Hepatic expression of BiP was measured by RT-PCR (Figure 42). Results showed a progressive increase in the values at different time infection periods until 24 hpi (+204%). Activation of UPR in infected rabbits was confirmed by quantification of the mRNA level of CHOP, a major marker of the ER stress response, and GRP94, a molecular chaperone and resident protein of the ER that aids in the folding of secretory and membrane proteins (Takayanagi *et al.*, 2013). Results showed a peak of mRNA expression for both chaperones at 24 hpi (CHOP: +440%, GRP94: +312%) (Figure 42).

7.3.1.5 Significance of hepatic apoptosis in RHDV-induced autophagy

Autophagy has a complex interaction with apoptosis as it can inhibit or cause cell death, and on the other hand apoptosis is known to inhibit the genesis of autophagy (Wang *et al.*, 2013c). Moreover, it is know that autophagy plays a major role in determining the fate of virally infected cells by blocking or promoting apoptotic mechanisms (Tovilovic *et al.*, 2014).

The activation of caspase-3 is the common event initiated by multiple different stimuli that induces apoptosis (Mauriz *et al.*, 2003). In this study, the samples were incubated with a specific fluorogenic substrate whose cleavage indicated that infection resulted in a marked increase of caspase-3 activity only at 30 (+275%) and 36 hpi (+292%) (Figure 43).

PARP-1 is a nuclear enzyme whose cleavage into a 85-kDA fragment by caspase-3 confirms that cells are undergoing apoptosis (San-Miguel *et al.*, 2006). According to our results, Western blot analysis demonstrated that at later infection periods there was a marked proteolysis of PARP-1 (30 hpi: +203%, 36 hpi: +298%) (Figure 44).

In order to further study the autophagy and apoptosis connection, we analyzed by Western Blot the hepatic expression of two anti-apoptotic proteins involved in the intrinsic pathway of apoptosis, Bcl-2 and Bcl-xL (Tuñón *et al.*, 2011a). The hepatic expression of Bcl-2 was increased at 12 hpi (+62%); however, our data also showed that at 30 and 36 hpi there was a significant inhibition of the expression of both proteins (Bcl-2, 30 hpi: -20%, 36 hpi: -30%; Bcl-xL, 30 hpi: -75%, 36 hpi: -82%) (Figure 45).

7.3.2 Effect of melatonin on the autophagic response induced by RHDV-infection

Once the role of autophagy in viral replication was demonstrated, we decided to study in a second experimental protocol the effect of melatonin on the autophagic response induced by RHDV-infection from 18 hpi, as in previous infection periods the virus presence was not detected and the changes observed were not significant for all the autophagic markers.

7.3.2.1 Effect of melatonin on oxidative stress markers associated to RHDV-induced autophagy

Glutathione is present in the oxidized form, which is readily converted to the reduced form by the enzyme glutathione reductase. In this study, we determined the GSH/GSSG ratio concentration as an oxidative stress marker. Oxidative stress is a common feature in different animal models of FHF, and it seems to play an important role in the pathogenesis of the disease, contributing to the apoptotic cell death (San-Miguel *et al.*, 2006).

GSH acts as a free radicals scavenger and is one of the principal defences against the oxidative stress (Crespo *et al.*, 2008). The GSH form decreased significantly and progressively in the RHDV-infected animals throughout the infection up to 36 hpi (-50.5%), corresponding with a significant increase in the GSSG concentration (+66.7%) (Table 4). Experimental infection with RHDV induced a significant increase in the GSSG/GSH ratio in the infected groups at 18 (+13%), 24 (+31.9%), 30 (+112.3%) and 36 hpi (+238.2%). As previously reported (Crespo *et al.*, 2010), these effects were partially prevented by melatonin treatment at 18 (GSSG/GSH: -12.4%, GSH: +13%) and 24 hpi (GSSG/GSH: -22.7%, GSH: +22.2%) and significantly abolished in the groups where melatonin was administrated at 30 (GSSG/GSH: -46.4%, GSH: +52.8%) and 36 hpi (GSSG/GSH: -57.3%, GSH: +57.9%) (Figure 46).

7.3.2.2 Effect of melatonin on the viral capsid protein VP60 expression

Once the presence of the virus in the RHDV-infected hepatocytes was determined, we decided to observe the effects of melatonin on viral replication on the experimental groups. Thus, mRNA expression of VP60 was examined by RT-PCR and a VP60 inmmunohistochemistry analysis was performed. Melatonin treatment resulted in a significant decrease in the VP60 mRNA expression in RHDV-infected groups starting at 24 hpi (-28.7%) and up to 36 hpi (-42.3%), showing a marked reduction at 30 hpi (-42.3%) (Figure 47). A significant decrease in VP60 immunolabelling was observed in infected animals that received the treatment at 24 (-80%), 30 (-31.7%), and 36 hpi (-31.1%) (Figure 48), revealing an inhibitory role of the indole on RHDV replication.

7.3.2.3 Effect of melatonin on diverse markers of RHDV-induced autophagy

Once demonstrated that RHDV-infection initiates a rapid autophagic response in vivo, we decided to elucidate the melatonin effect on the autophagic response in the experimental groups. Thus, the level of expression of the main autophagic markers was studied by RT-PCR. Results obtained from the first experimental protocol were confirmed by the data observed in this research, where a positive regulation of the components of the Atg12-Atg5-Atg16L1 complex was detected and a significant increase of beclin-1 expression was observed at 18 and 24 hpi (Atg12, RHDV18: +93%, RHDV24: +35%; Atg5, RHDV18: +70%, RHDV24: +49%; Atg16L1, RHDV18: +77%, RHDV24: +14%; beclin-1, RHDV18: +122%, RHDV24: +134%) (Figures 49 and 50). The modulatory role of melatonin regarding the activation of the autophagic mechanism was first detected at 18 hpi, observing a decrease in Atg16L1 and beclin-1 mRNA levels in the groups of rabbits that received the treatment (Atg16L1: -42%, beclin-1: -20%) (Figures 49 and 50). At 24, 30 and 36 hpi the levels of the autophagic markers decreased significantly in the infected animals that received melatonin compared with RHDV-infected rabbits at the same post-infection periods (Atg12, RHDV24+Mel: -30%, RHDV30+Mel: -52%, RHDV36+Mel: -42%; Atg5, RHDV24+Mel: -53%, RHDV30+Mel: -40%, RHDV36+Mel:-48%; Atg16L1, RHDV24+Mel: -50%, RHDV30+Mel: -43%, RHDV36+Mel: -53%; beclin-1, RHDV24+Mel: -60%, RHDV30+Mel: -41%, RHDV36+Mel: -22%); in some cases the values were even lower than the Control group (Atg12, RHDV30+Mel: -57%, RHDV36+Mel: -47%; Atg5, RHDV24+Mel: -30%, RHDV30+Mel: -22%, RHDV36+Mel: -51%; Atg16L1, RHDV24+Mel: -43%, RHDV30+Mel: -51%, RHDV36+Mel: -62%; beclin-1, RHDV36+Mel: -32%) (Figures 49 and 50).

As previously indicated, LC3 is the principal autophagy marker. Western blot data indicated that LC3-II expression increased markedly at 18 and 24 hpi (RHDV18: +100%, RHDV24: +430%), with a maximum increment of LC3-II/LC3-I ratio at 24 hpi, which suggests that RHDV induce the accumulation of autophagosomes in the

hepatocytes during early infection periods. Melatonin treatment reduced the LC3 hepatic expression at 24 hpi (RHDV24+Mel: -28%) without any changes in the remaining infection periods (Figure 51).

As previously reported, the accumulation of LC3-II could be due to the augmentation of the autophagosomes synthesis, to a decreased fusion with the lysosomes and/or to a suppression of the proteolytic turnover in the autophagolysosomes. In order to answer this question, a double immunofluorescence for the autophagosomal and lysosomal markers, LC3 and LAMP-1 respectively, was performed (Figure 52). Immunoflourescence analysis of LC3 showed spots of green fluorescence which reached a maximum of expression at 24 hpi, suggesting an elevated turnover of autophagosomes. At 18 hpi, there was little co-localization between LC3 and LAMP-1, but extensive overlap was observed at 24 hpi, presumably due to an increased accumulation of autophagolysosomes.

Moreover, p62/SQSTM1 mRNA expression was analyzed by RT-PCR with the aim of investigate the melatonin role on the autophagic response induced by the RHDV (Figure 53). Data from the rabbits which received melatonin treatment showed a significant decrease in p62/SQSTM1 mRNA expression compared to the infected groups of rabbits at the same infection periods (RHDV18+Mel: -31%, RHDV24+Mel: -32%, RHDV30+Mel: -42%, RHDV36+Mel: -35%). At 30 and 36 hpi, a significant diminishing in mRNA expression was observed in the RHDV-infected animals treated with melatonin compared to the Control group (-25% and -47%, respectively).

In summary, the autophagic response in RHDV-infected rabbits was partially inhibited by melatonin treatment, as shown inthe reduced mRNA expression of the autophagic markers: Atg12, Atg5, Atg16L1 and beclin-1 (Figures 49 and 50), the decrease in LC3-II protein expression (Figure 51), and the attenuated LC3 immunofluorescent staining (Figure 52).

7.3.2.4 Effect of melatonin on ER stress associated to RHDV-induced autophagy

ER stress has been reported to induce the accumulation of autophagosomes, and autophagy may be an important part of normal ER function (Ogata *et al.*, 2006). As indicated above, the expression of three major ER chaperones, BiP/GRP78, CHOP and GRP94 was increased in the early stages of the RHDV infection. Therefore, in the present study, with the objective of corroborating these effects and verifying the melatonin role on the ER stress associated to the autophagic mechanism during the RHDV-infection course, CHOP and BiP/GRP78 were analyzed by RT-PCR (Figure 54). As expected according with the data shown in the previous experimental protocol, mRNA levels for both chaperones increased at the different infection periods, reaching a maximum value at 24 hpi (CHOP, RHDV18: +289%, RHDV24: +572%, RHDV30: +144%; BiP, RHDV18: +164%, RHDV24: +202%, RHDV30: +116%, RHDV36: +29%). This effect was significantly inhibited by melatonin administration (CHOP, RHDV18+Mel:-20%, RHDV24+Mel: -61%, RHDV30+Mel: -44%, RHDV36+Mel: -37%; BiP, RHDV24+Mel: -23%, RHDV30+Mel: -37%, RHDV36+Mel: -39%).

7.3.2.5 Effect of melatonin on hepatic apoptosis associated to RHDV-induced autophagy

According to the obtained data and results previously shown, the melatonin effect on the apoptotic markers was studied in RHDV-infected rabbits starting at 18 hpi with the aim of compare them with RHDV-infected rabbits without treatment.

Some publications have reported that the apoptotic pathway is related to the autophagic response (Levine *et al.*, 2008). Therefore, caspase-3 activity was analyzed incubating the samples with the specific fluorogenic substrate Ac-DEVD-AMC. The substrate excision resulted in a significant increase in caspase-3 activity in the later RHDV-infection periods (30 hpi: +442%, 36 hpi: +500%) as well as in the rabbits which received melatonin administration (30 hpi: +232%, 36 hpi: +342%) comparing them with Control group without observed changes between 18 and 24 hpi. Melatonin treatment, however, inhibited markedly the increment observed in the RHDV-infected groups at 30 (-38%) and 36 hpi (-26%) (Figure 55).

Moreover, the hepatic expression of PARP-1, a nuclear enzyme which cleavage triggers apoptosis (Mauriz *et al.*, 2003), was analyzed by Western Blot. Results revealed an increase in PARP-1 proteolysis in the later periods of the infection in RHDV-infected animals (30 hpi: +200%, 36 hpi: +245%) compared with the infected rabbits that received melatonin (30 hpi: +130%, 36 hpi: +120%) regarding to Control group values. These anti-apoptotic effects of melatonin were confirmed by the significant decrease observed in PARP-1 hepatic expression at 30 (-23%) and 36 hpi (-36%) compared with RHDV-infected rabbits without treatment (Figure 56).

7.3.3 Effect of melatonin on ER stress and apoptosis in a FHF model induced by RHDV

In previous studies our research group showed that during the experimental infection with RHDV, biochemical data and the expression of genes involved in different molecular pathways of damage, apoptosis and regeneration changed significantly between 36 and 48 hpi (Tuñón *et al.*, 2003; García-Lastra *et al.*, 2010; Tuñón *et al.*, 2011a,b). Therefore, once the effect of melatonin on main markers involved on ER stress and apoptosis during RHDV-infection was analyzed, significant changes occurred at 30 and 36 hpi. Thus, we decided to deepen into the pathogenic mechanisms of the virus on these two molecular pathways and study the effect of

melatonin on them during experimental infection with RHDV just at 36 hpi. Furthermore, we aimed to determine whether the effect of melatonin on the different molecular markers acts in a dose-dependent manner.

To confirm whether ER stress was induced in RHDV-infected rabbits, immunohistochemistry for CHOP, a major marker of the ER stress response, was performed. Immunoreactivity for CHOP was negative in liver sections from control rabbits. Compared to the RHDV-infected group, immunoreactivity was markedly reduced in a dose-dependent manner in animals receiving melatonin (Figure 57).

The transcription factors ATF6, ATF4 and XBP1s regulate the expression of ER chaperones that enhance the folding capacity of the ER, including CHOP, as well as other stress genes such as BiP, GRP94 and the tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2). The induction of FHF by the RHDV resulted in significant increases in the mRNA levels of PERK, ATF6, ATF4, IRE1, XBP1s, TRAF2, CHOP, BiP and GRP94. The extent of changes was significantly attenuated in the rabbits that received melatonin, however, in TRAF2 and BiP values a dose-dependent effects were observed (Table 5).

The obtained results demonstrate that the liver injury reduction by melatonin is associated with the direct ER stress attenuation through the modulation of the three branches of the UPR.

We have previously reported that melatonin treatment inhibits apoptosis in RHDV-infected rabbits through the reduction of caspase-3 immunoexpression and activity and PARP-1 proteolysis (Tuñón *et al.*, 2011a). Therefore, to confirm the correlation between the levels of ER stress and apoptotic cell death, a double immunofluorescenceanalysis for CHOP and for cleaved caspase-3 was performed in liver sections. Double staining showed colocalization of both CHOP and cleaved caspase-3 in liver from RHDV-infected rabbits. Immunostaining decreased considerably with melatonin treatment (Figure 58).

Endoplasmic reticulum stress also induces phosphorylation of JNK, a family member of the stress-activated protein kinases, whose activation has been proposed to be a pro-apoptotic event through direct phosphorylation of mitochondrial proteins and causes cleavage of caspase-12, which initiates downstream apoptotic pathways (Zhang and Kaufman, 2008). Thus, we further determined the expression of the active phosphorylated form of JNK and caspase-12 by Western blot. As previously demonstrated in our study, the anti-apoptotic effect of melatonin was evident revealing a significant decrease of p-JNK expression in both melatonin doses compared with values of RHDV-infected rabbits without treatment (RHDV+Mel10: -40%, RHDV+Mel20: -43%) (Figure 59).

Melatonin administration also inhibited the observed augmentation in caspase-12 hepatic expression in RHDV-infected rabbits (RHDV+Mel10: -30%, RHDV+Mel20: -51%) in a dose dependent manner (RHDV+Mel20: -30% compared with RHDV+Mel10 group) (Figure 60).

Once elucidated the activation mechanism of ER stress through the three major pathways of the UPR in our animal model of FHF of viral etiology, we decided to evaluate whether inhibition of ER stress and UPR inhibition is an underlying mechanism of melatonin anti-apoptotic effects. Therefore, with the aim of investigate the possible effects of melatonin involved on the ER stress and UPR signaling pathways, the hepatic expression of the proteins ATF6 α , CHOP, p-IRE1, XBP1s, BiP and p-PERK was analyzed by Western blot in extracts from liver tissue. Data obtained indicate that RHDV infection caused higher expression of these proteins. However, these effects were significantly reduced in RHDV-infected rabbits treated with melatonin (ATF6 α , RHDV+Mel10: -49%, RHDV+Mel20: -56%; CHOP, RHDV+Mel10: -30%, RHDV+Mel20: -67%; p-IRE1, RHDV+Mel10: -17%, RHDV+Mel20: -29%; XBP1s, RHDV+Mel10: -17%, RHDV+Mel20: -29%; BiP, RHDV+Mel10: -35%, RHDV+Mel20: -39%) (Figures 61, 62, and 63).

7.4 Discussion

7.4.1 Effects of RHDV on autophagic response

7.4.1.1 Expression of the viral capsid protein VP60

The aim of this research was to assess the occurrence of autophagy during experimental infection with the RHDV. We employed VP60 as a viral marker, observing an exponential increase in the VP60 mRNA expression from 18 hpi. This increase was significant from 24 hpi, reaching a peak at 36 hpi.

RHDV is a positive-sense single-stranded RNA virus, which possesses a major structural capsid protein, VP60. This plays an important role in virus diagnosis, and is the main target of the host immune defence against RHDV (Esteves *et al.*, 2008) as it is immunodominant and possessing the major neutralizer epitopes (Abrantes *et al.*, 2012).

With the objective of verifying *in situ* the presence of the RHDV in the experimental groups, immunohistochemistry was performed. Labelling was not found either in Control group nor in infected rabbits from the group of animals killed at 12 hpi. Viral VP60 was first detected in hepatocytes from animals sacrificed at 18 hpi. The extent of labelling increased markedly at 24 hpi, with the labelled hepatocytes mainly found in the periportal area. At 30 and 36 hpi, the liver revealed an extensive viral VP60 antigen immunolabelling. These results are similar to those obtained by other authors (Abrantes *et al.*, 2012).

The rabbits younger than 6-8 weeks-old are resistant to the disease. However, viral antigen has been detected in hepatocytes from experimentally-infected 2-weeks old rabbits (Mikami *et al.*, 1999), although in most studies it has only been identified in rabbits older than 4-weeks old (Prieto *et al.*, 2000; Shien *et al.*, 2000). Viral antigens were scatteredly distributed and only present in a small percentage of cells. Nevertheless, this suggests that some hepatocytes in young rabbits are able to support viral replication. In addition, clearance of the virus seems to be extremely rapid as no viral antigens were detected after day 4 post-infection (Shien *et al.*, 2000).

7.4.1.2 Dectection of autophagic vesicles in RHDV-infected hepatocytes by transmission electron microscopy

Autophagy was first monitored by TEM more than 50 years ago (Eskelinen *et al.*, 2011). The degradation of cytoplasmic areas isolated by the phagophore is the morphological hallmark of autophagic processes. TEM can give both quantitative and qualitative information about the sequential changes occurring in the autophagic

structures: phagophore, autophagosome, amphisome, autolysosome and autophagic body (Ylä-Anttila *et al.*, 2009).

Autophagosomes have a double membrane that is partly visible as two parallel membrane bilayers separated by an electron-lucent cleft. Autophagosomes contain cytosol and/or organelles that look morphologically intact, that is similar to the cytosol and organelles elsewhere in the cell. Amphisomes can sometimes be identified by the presence of small internal vesicles inside the autophagosome. These internal vesicles are delivered into the lumen by fusion with endosomes. Late autophagic vacuoles and autolysosomes usually have only one limiting membrane, and contain cytoplasmic material and/or organelles at various stages of degradation (Klionsky *et al.*, 2012).

In this research the autophagic response during RHDV-infection was examined. According to other studies conducted with viruses that promote autophagy, TEM analysis showed an increased content of autophagy vesicles in RHDV-infected livers from early infection periods. Between 18 and 24 hpi lysosomal and mitochondrial levels were augmented, observing electron-dense cytoplasmatic material and doublemembrane autophagosomes with engulfed damaged organelles.

TEM of ultrathin sections revealed the presence of numerous doublemembrane vesicles, resembling those observed for other positive RNA viruses such as flavivirus, poliovirus and coronavirus. Similar to most of them, RHDV induces changes in host cell membranes forming different structures. By analogy to other virus, as HCV, RHDV may induce double-membrane vesicles through the activation of the autophagy pathway (Ferraris *et al.*, 2010). The specific role in autophagy stimulation by these viruses remains unknown (Miller and Krijnse-Locker, 2008), but it has been suggested that the recent synthesized autophagosomes may provide a physical scaffold for the replication complex where the viral RNA synthesis could be developed (Kirkegaard *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2008). This could represent a strategy to conceal the viral RNA and help the virus to evade host antiviral response.

7.4.1.3 Effects of RHDV-infection on diverse autophagic markers

We further analyzed the impact of RHDV infection on several proteins that regulate distinct molecular events leading to autophagy vesicle formation, including its initiation (beclin-1), and maturation by the Atg12-Atg5-Atg16L1 and LC3-PE conjugation systems.

Data obtained demonstrate an early increase in the expression of the Atg12-Atg5-Atg16L1 complex components from the early infection periods, together with an enhanced LC3 immunostaining and conversion of soluble cytosolic LC3-I to its lipidated, autophagosome-associated form LC3-II. This unequivocally demonstrates that the autophagy was induced from early stages in RHDV-infected rabbits.

The autophagic machinery and Atg proteins are altered by many viral pathogens in order to develop functions that enhance viral replication. The multifunctional and highly adaptable nature of the Atg proteins confers them susceptibility and are used by the viruses in their own benefit. Many viruses such as HIV-1, HBV, HCV and poliovirus have evolved mechanisms to avoid or subvert the autophagic machinery in order to increase viral replication (Yordy and Iwasaki, 2011). After analyzing the most representative autophagic markers using a variety of molecular techniques, an increased value in RHDV-infected rabbits between 18 and 24 hpi was observed; however, during the subsequent infection points, at 30 and 36 hpi the hepatic expression of markers such as LC3-II and the mRNA levels of the Atg12-Atg5-ATG16L1 complex components decreased notably, in some cases even to values lower than the Control group.

Viruses such as poliovirus, rhinovirus, and murine hepatitis virus-3 (MHV)-3 induce autophagy in their own benefit to improve their life cycles. These viruses modify autophagic machinery and are able to use the autophagosomal membrane as their replication site (Ke and Chen, 2012). Therefore, data collected during the course of RHDV infection concerning the main autophagic markers and the exponential increase in VP60 mRNA expression suggest that RHDV infection may induce autophagy from early infections periods in order to enhance its replication.

RT-PCR results confirmed that the key autophagy gene beclin-1, involved in the autophagy regulation, was also activated. Relative mRNA expression increased significantly in RHDV-infected animal batches compared to the Control group. This result may suggest that beclin-1 plays a crucial role in the induction of the autophagic response by the RHDV. We also analyzed the UVRAG mRNA expression. UVRAG interacts with beclin-1 during the early infection phases, contributing to the maturation process of the autophagosomes (Zhao *et al.*, 2012). A peak at 18 hpi in UVRAG expression was observed. Although beclin-1 up-regulation is a frequent finding during viral infection (Kudchodkar and Levine, 2009), some studies with enterovirus 71 infection demonstrated that autophagy induction is independent of beclin-1 (Huang *et al.*, 2009) and a late and limited increase in the expression of this pro-autophagic protein by HSV-1 infection has also been reported (Tovilovic *et al.*, 2013).

In our experiments, p62/SQSTM1 expression increased from 12 hpi and remained elevated at 24 hpi. p62/SQSTM1 is a multifunctional protein, involved in the delivery of ubiquitin-bound cargo to the autophagosome. This protein interacts with LC3 and is specifically degraded in the autophagic-lysosome pathway, being commonly measured in order to detect the autophagic flux (Pankiv *et al.*, 2007). Infections with different herpesviruses result in a decrease of p62/SQSTM1 in parallel to an increase in

the protein LC3-II (Takahashi *et al.*, 2009; Montagnaro *et al.*, 2013). However, upregulated expression of both p62/SQSTM1 and LC3 has been shown to exist in different types of tumours, whose growth is significantly inhibited by p62/SQSTM1 down-regulation (Ren *et al.*, 2013). Moreover, the expression of p62/SQSTM1 and LC3-II also increase in livers from patients with primary biliary cirrhosis and cultured biliary epithelial cells treated with hydrogen peroxide (Sasaki *et al.*, 2012). In Huh 7.5 cells it has been reported that after the transfection of the HCV RNA there is a continuous increase of p62/SQSTM1 which indicates that HCV does not enhance autophagic protein degradation (Sir *et al.*, 2008). Results from the present research suggest a similar response to RHDV infection, as an up-regulation of p62/SQSTM1 expression was observed during the early infection phases. This fact may reflect an incomplete response suggesting that the autophagy alone is unable to process the damage proteins bound to p62/SQSTM1.

mTOR is an important signaling molecule which in nutrient-proficient cells acts as a negative regulator of autophagy (Tovilovic et al., 2013). When the hepatic expression of p-mTOR was quantified by Western blot assay, an increased expression between 12 and 24 hpi was observed, showing that RHDV infection stimulates the mTOR signaling pathway in parallel to the development of the autophagic process. Similar unexpected results have been previously reported in HCV-infected human hepatocytes (Shrivastava et al., 2012), in U251 glioma cells after infection with the Newcastle virus (Meng et al., 2012), and in bovine kidney cells infected with the bovine herpesvirus type-4 (Montagnaro et al., 2013). Our data demonstrate that mTOR does not act as a negative regulator during RHDV-induced autophagy. Data could indicate that either induction of autophagy occurs upstream of mTOR signaling or that both processes act concurrently. In HCV-infected hepatocytes it has been suggested that mTOR activation is necessary for cell growth through the regulation of phosphoeukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein (EBP)1 (Shrivastava et al., 2012). Nevertheless, further research would be necessary to identify if there is a similar requirement following RHDV-infection course.

7.4.1.4 Significance of ER stress in RHDV-induced autophagy

Autophagy is also triggered in response to ER stress through the induction of the UPR (Ding *et al.*, 2007). In mammalian cells, knockdown of the upstream UPR regulator BiP inhibits autophagosome formation, but does not affect the conversion of LC3-I to LC3-II, suggesting that ER stress induction is an obligatory mechanism for autophagy development and may contribute in the phagophore expansion rather than in the induction step (Li *et al.*, 2008). Previous studies have shown that induction of autophagosomes formation by the HCV infection depends on the UPR (Sir *et al.*, 2008), and the three branches of the UPR contribute to regulate HCV replication through the
modulation of autophagy (Shinohara *et al.*, 2013). It has also been reported that the tobacco mosaic virus RNA induces ER stress-related autophagy in HeLa cells (Li et al., 2012), and it is known that autophagosome formation during varicella-zoster virus infection is a consequence of ER stress and the UPR activation (Carpenter *et al.*, 2011).

In this research, the mRNA levels of the molecular chaperones CHOP, BiP and GRP94 that play an important role in the ER reached a peak at 24 hpi, in parallel to an increase in the expression of beclin-1 and the components of the two ubiquitin-like conjugation systems: Atg12-Atg5-Atg16L1 and LC3. Therefore, our data suggest that autophagy could be induced, at least in part, by the ER stress during RHDV infection. This hypothesis is further supported by the increase in the up-regulation of beclin-1, whose expression is required for ER stress-induced autophagy (Li *et al.*, 2008).

7.4.1.5 Significance of hepatic apoptosis in RHDV-induced autophagy

The interplay between autophagy and programmed cell death is complex. Autophagy is a cytoprotective mechanism which enables cellular survival under unfavourable growth conditions and can prevent cell death by apoptosis. However, some studies have demonstrated that autophagy may have an active contribution to cell death in virus-infected cells. Thus, it has been reported that pharmacological inhibition of autophagy efficiently suppresses apoptosis induced by human adenovirus type 5 Delta-24-RGD mutant in mouse fibroblast or human U251 glioma cells (Jiang *et al.*, 2011). Blocking of autophagy also attenuates cell death caused by the avian influenza A H5N1 virus both *in vitro* and *in vivo* (Sun *et al.*, 2012), and it is known that knockdown of beclin-1 or Atg5 protects human rhabdomyosarcoma cells from enterovirus 71-induced apoptotic death (Xi *et al.*, 2013).

We and others have previously reported that RHDV infection induces in rabbits an important apoptotic response at 36-48 hpi with an increased immune expression and caspase-3 activity, as well as a significant PARP-1 proteolysis (San-Miguel *et al.*, 2006; García-Lastra *et al.*, 2010; Tuñón *et al.*, 2011a; Niedźwiedzka-Rystwej and Deptuła, 2012). Results from the present study indicate that apoptosis is present in the late stages of the disease, 30 and 36 hpi, with no significant increase in caspase-3 activity and PARP-1 degradation or decreased expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 or Bcl-xL occurring in early periods. The fact that autophagy develops in hepatocytes at early stages and cells begin to exhibit apoptosis in parallel to the decline of the autophagy response, suggests that autophagy play a beneficial role in an attempt to protect cells from the impending noxious effects of the virus.

It has been recently shown that cardiomyocites exposed to angiotensin II exhibit a similar behavior, with autophagy occurring at early stages whereas apoptosis

occurs late (Wang *et al.*, 2013c). A number of studies have also demonstrated the ability of virally-induced autophagy to prevent or delay the death of infected cells. For example, apoptotic death of hematoma cells expressing the oncogenic HBV X protein increases when autophagy is blocked (Mao *et al.*, 2011), and the infection with Japanese encephalitis virus increases caspase activation and cell death in beclin-1 or Atg5-deficient cells (Jin *et al.*, 2013). It has also been shown that in HSV-1-infected U251 glioma cells the autophagic response markedly delayed caspase activation and other hallmarks of apoptotic cell death (Tovilovic *et al.*, 2014).

Data obtained could also indicate that RHDV-induced autophagy plays a cytoprotective role as it triggers the survival in the infected cells, suggesting that autophagy might contribute to limit the pathological consequences associated with cell death caused by the RHDV infection. In order to confirm the connection between autophagy and RHDV pathogenicity the use of cell culture systems should be required, although unfortunately they are unavailable at present (Abrantes *et al.*, 2012).

An additional interesting finding concerns the increased expression of p62/SQSTM1 observed in infected hepatocytes. This result reflects a certain inhibition of the autophagosome-lysosomal function and a dysfunctional autophagy, which may contribute to the alteration of the signal transduction pathway and in the liver damage (Mathew *et al.*, 2009). In fact, it is known that upregulation of p62/SQSTM1 positively controls apoptosis by polyubiquitination and aggregation of the key initiator caspase 8 (Jin *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2013b), thus playing a potential role in the crossregulation between autophagy and apoptosis.

7.4.2 Effect of melatonin on the autophagic response induced by RHDV-infection

7.4.2.1 Effect of melatonin on oxidative stress markers associated to RHDV-induced autophagy

In order to complete previous results regarding the effects of melatonin on the significantly modified signaling mechanisms by the RHDV, additional studies were carried out in batches of rabbits sacrificed at 18, 24, 30 and 36 hpi. First, diverse oxidative stress markers were determined. The molecular ratio between GSSG and GSH, sensitive indicators of the cellular redox state was significantly increased in RHDV-infected animals. Oxidative stress is a common finding in different animal models of FHF, and appears to play an important role in the pathogenesis of the disease, contributing to apoptotic cell death (San-Miguel *et al.*, 2006).

The non-protein thiol, GSH serves as a scavenger of different free radicals and is one of the major defences against oxidative stress (Crespo *et al.*, 2008). In this study, a notably reduction in GSH levels was observed in RHDV-infected animals during the infection course, which may be due to an excessive use of this antioxidant for scavenging free radicals, a lowered synthesis or an increased degradation to generate cysteine required in other potentially damaged tissues (García-Lastra *et al.*, 2010). However, in infected and melatonin-treated rabbits we found a significant reduction of GSSG/GSH ratio in late infection periods (30 and 36 hpi). Therefore, these data suggest that the observed reduction in oxidative stress through the quantification of the GSSG/GSH ratio could contribute to the inhibitory effect of the indole on the autophagic response induced during the viral infection. Moreover, results confirm, as reported in previous studies, that melatonin is able to regulate and/or maintain the intracellular concentration of glutathione and prevent oxidative stress (Reiter *et al.*, 2000; Crespo *et al.*, 2010).

In addition, although the mechanism used by the specific reactive oxygen/nitrogen species for triggering specific autophagic responses remains unknown, a novel hypothesis that is gaining support is that autophagic process is sensitive to oxidative stress and to the accumulation of reactive species (Lee *et al.*, 2012). Indeed, a recent study indicates that oxidative stress induces the accumulation of autophagic structures without the increase of the degradation of long-lived proteins in human neuroblastoma cells infected by HSV-1 infection (Santana *et al.*, 2013).

7.4.2.2 Effect of melatonin on the viral capsid protein VP60 expression

After identifying and quantifying the RHDV presence in the first experimental protocol of the present research, we decided to observe the effects of melatonin on viral replication in the experimental groups. Immunohistochemical analysis for the viral antigen VP60 revealed a decreased immunoreactivity in the indole-treated rabbit groups compared to untreated animals, in addition to a marked reduction in VP60 expression was detected. Therefore, data propose that melatonin reduces the RNA replication of the RHDV.

The decrease observed in the RNA replication in RHDV-infected and melatonintreated rabbits is a consequence, at least partially due to its negative effect on the ER stress and on the autophagic response. Both DENV and HCV are known to exploit the UPR-autophagy pathway to promote replication by suppressing innate antiviral immunity (Zhang *et al.*, 2005a; Ke and Chen, 2011), and a number of *in vitro* and *in vivo* studies have documented that melatonin plays an important role in innate immunity (Calvo *et al.*, 2013).

7.4.2.3 Effect of melatonin on diverse markers of RHDV-induced autophagy

Results from the first experimental protocol demonstrate that the experimental RHDV-infection induced autophagosome and autophagolysosome formation. An increase in beclin-1 expression, accompanied by an increase in the expression of the two major conjugation systems required for the autophagosomes formation, LC3-II and Atg12-Atg5-Atg16L1 in early infective periods (18 and 24 hpi) was observed. Furthermore, the co-localization of LC3 and LAMP-1 was monitored by immunofluorescence, showing a marked colocalization at 24 hpi, possibly due to an increased accumulation of autophagolysosomes. In non-autophagic cells, LC3, an autophagosomes marker, and LAMP1, a late endosomes and lysosomes marker, do not co-localize. However, during the RHDV-induced autophagy, LC3 co-localizes with LAMP-1, revealing a new intracellular arrangement, the maturation of emerging autophagosomes to autophagosomes, and the fusion of autophagosomes with late endosomes and/or lysosomes (Munafo and Colombo, 2001; Jackson et al., 2005). In addition, the parallel increase in p62/SQSTM1 expression during the initial infection stages may reflect a dysfunctional autophagy similar to that observed in other studies carried out by the experimental infection of hepatocytes with other positive RNA virus (Air-Goughoulte et al., 2008, Sir et al., 2008).

As previously indicated, although autophagy could act as a cellular mechanism for the elimination of viral particles, different viruses seem to use the autophagic response to increase their own replication. The optimal production of positive RNA viruses depends on the initiation of the autophagic pathway during infection. This is a paradox, because the autophagic process promotes the degradation of the cytosolic content, and positive RNA viruses replicate in the cytosol (Richards and Jackson, 2013).

The physical hallmark of the autophagic pathway is the formation of doublemembrane cytosolic vesicles, the autophagosomes. For example, replication of poliovirus depends on the formation of this double membrane (Taylor and Kirkegaard, 2007); however, if the autophagosomal degradation pathway is not altered by viral mechanisms, the vesicles will be fused with lysosomes and its contents degraded. Nevertheless, several studies have demonstrated that enterovirus coxsackie B3 has developed strategies to avoid the elimination of the vesicles by inhibiting, during *in vitro* and *in vivo* infection, the maturation of amphisomes and the degradation of autophagic proteins (Wong *et al.*, 2008). Other viruses, such as DENV and/or coronavirus also employ the autophagic machinery in order to facilitate their replication (Maier and Britton, 2012; Lee *et al.*, 2013); and HCV uses autophagy for the translation of early proteins (Dreux *et al.*, 2009).

After analysing the main autophagic markers, data obtained also revealed that the RHDV-induced autophagic response was inhibited in animal groups that received melatonin administration. Clinical trials have demonstrated that melatonin is efficient in preventing acute and chronic cell damage. The beneficial effects of melatonin can be explained by its properties as a potent antioxidant, its ability to induce antioxidant enzymes, as a regulator of apoptosis and a stimulator of immune functions. These effects support the beneficial actions of melatonin on viral infections which are often associated with inflammatory injury and oxidative stress. The indole is able to eliminate the negative molecular processes that are usually activated when viruses invade cells (Boga *et al.*, 2012). The inhibitory effects of melatonin on viral replication observed in this study could be due to the reduced autophagic response triggered in RHDV-infected rabbits that received melatonin.

7.4.2.4 Effect of melatonin on ER stress associated to RHDV-induced autophagy

Mechanisms employed by viruses to induce autophagy remain unclear. One of the typical stress responses initiated by viral infection is ER stress, which downregulates protein synthesis through the three branches of UPR. During ER stress, different transcription factors regulate the expression of ER chaperones, such as CHOP and BiP, which enhance the folding capacity of the ER (Zhang and Wang, 2012). It is known that sensors of the UPR control the signal-transduction pathways leading to the transcription of autophagic genes that regulate this mechanism (Huang *et al.*, 2011); furthermore viruses capable of inducing ER stress also have the potential to induce an autophagic response. Thus, previous studies have demonstrated that autophagy is associated to ER stress in HCV infection, and that the persistent induction of ER stress and the incomplete activation of autophagy plays an important role in HCV pathogenesis (Sir *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2013a). In addition, it has been reported that in mouse embryonic fibroblast cells infected with the Chikungunya virus, independent induction of ER and oxidative stress pathways triggers autophagy through the inhibition of mTOR (Joubert *et al.*, 2012).

Moreover, it is known that ER stress may play a positive role in HCV RNA replication through activation of autophagy, because siRNAs targeted to the sensors of the different branches of the UPR (PERK, IRE1 and ATF6) reduce HCV RNA levels and suppress HCV-induced lipidation of LC3, required for autophagosomes formation (Sir *et al.*, 2008). It has also been reported that inhibitors of XBP-1, one of the ER stress mediators, inhibit in parallel HCV viral replication and autophagy in hepatoma cells (Shinohara *et al.*, 2013).

Therefore, the reduction of oxidative stress and ER by melatonin treatment published in previous works (Crespo *et al.*, 2010) and confirmed in this study by the reduction in CHOP and BiP expression in RHDV-infected rabbits that received melatonin could contribute to the inhibitory effect of melatonin on the autophagic response induced by the RHDV.

7.4.2.5 Effect of melatonin on hepatic apoptosis associated to RHDV-induced autophagy

In our research, the autophagic activity induced by the RHDV declined in late periods of infection (30-36 hpi) in parallel to the increase in apoptosis. Different studies have previously shown that virally induced autophagy is capable of preventing the early apoptotic death of cells (Joubert *et al.*, 2012), which suggests, as indicated above, that autophagy might contribute to limit the cytopathic effect of certain viruses and the pathological consequences associated with cell death triggered by viral infection. This regulation of programmed cell death by autophagy could also occur in RHDV-infected hepatocytes. However, molecular mechanisms responsible for the regulation of apoptosis by autophagy and for the overwhelming effect of the apoptotic response by the inhibitory effect of autophagy remain unknown.

Melatonin is able to induce or inhibit autophagy based on cellular necessities and oxidative stress levels. There are some reports indicating that autophagy and survival are significantly enhanced in ischemic N2a cells treated with melatonin (Guo *et al.*, 2010); other studies have demonstrated that melatonin-induced autophagy protects against human prion protein-mediated neurotoxicity (Jeong *et al.*, 2012). Moreover, melatonin induces autophagy and results in the effective removal of mutant transforming growth factor- β (TGF- β)-induced protein (TGFBIp) from granular corneal dystroph type 2 fibroblasts (Choi *et al.*, 2012). In contrast, melatonin is known to protect HeLa cells from rotenone-induced cell injury via inhibition of autophagy (Zhou *et al.*, 2012), to suppress cyclosporine A-induced autophagy in rat pituitary GH3 cells (Yoo and Jeung, 2010), to inhibit kainic acid-induce neurotoxicity in mouse hippocampus via inhibition of autophagy (Chang *et al.*, 2012), and to attenuate methamphetamine-induced autophagy (Nopparat *et al.*, 2010).

Consistent with studies that report parallel inhibition of autophagic processes and programmed cell death, in the present experiments both autophagy and apoptosis were significantly inhibited by melatonin. These effects of the indole could be the consequence of its antioxidant action, which may directly antagonize mechanisms contributing both to the intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis (Tuñón *et al.*, 2011a), but also result in the inhibition of ER stress and, in turn, in diminished autophagic and apoptotic responses.

7.4.3 Effect of melatonin on ER stress and apoptosis in a FHF model induced by RHDV

There is increasing evidence that apoptosis triggered by ER stress is involved in the pathogenesis or exacerbation of a number of widespread diseases, which makes this process a tempting target for therapeutic intervention. However, many of the studies use one or just a few ER stressors and cell types, and thus, a rapid progression to more pathophysiologically relevant animal models is essential. Thus, RHDV infection constitutes a highly reproducible model of viral-induced FHF and it is of considerable interest to investigate new therapeutic avenues in order to attenuate liver damage and improve survival in FHF of viral etiology. In this last experimental protocol we decided to delve in the last infection phase which is previous to rabbit death caused by the FHF, to elucidate the ER stress and apoptosis mechanisms involved in the pathogenesis of a variety of severe liver diseases.

ER stress activates the endogenous ER chaperones CHOP, BiP and GRP94encoding genes. Both CHOP and GRP94 are good markers of ER stress, because they are expressed specifically under the conditions of ER dysfunction (Zhang and Kaufman, 2008). BiP has been recently shown to play a central role modulating the sensitivity and duration of the UPR (Gardner and Walter, 2011), and enhanced expression of BiP mRNA in liver is indicative of ongoing ER stress. Data from the present study showed an increased expression of CHOP, BiP and GRP94 at 36 hpi in the liver of RHDVinfected rabbits, and demonstrated the induction of ER stress in this animal model of FHF. Melatonin treatment reduced the expression of the three chaperones, indicating that the inhibition of the ER stress response may play a role in the protective effect of the indole. Our results support previous research indicating that amelioration of liver injury by a specific inhibitor of glycogen synthase kinase 3β in a murine FHF model induced by D-galactosamine treatment (Chen *et al.*, 2012) or co-administration of prostaglandin E1 with somatostatin after massive hepatectomy in rats is associated with reduced expression of CHOP (Jia *et al.*, 2013).

The signaling pathway activated by disruption of ER homeostasis, the UPR, has been linked to apoptosis. Progress in the field has provided insight into the regulatory mechanisms and signaling cross-talk of the three branches of the UPR, which are initiated by the stressors protein kinase PERK, IRE1 α and ATF6. To further characterize the effect of melatonin in stress signaling induced by RHDV infection, mRNA levels of factors involved in the three individual UPR signal transduction pathways were investigated. Significant increases in the mRNA levels of the three stressor proteins and upregulation of different stress response genes in the different UPR branches were observed in RHDV-infected animals. Therefore, data from the present study indicate that the three branches of UPR and their downstream targets are activated in rabbits with FHF induced by infection with the RHDV. Results obtained also demonstrate that effects of RHDV infection on the different UPR signaling branches were inhibited in melatonin-treated rabbits, offering mechanistic insights and potential therapeutic targets for the indole.

We have previously reported a significant induction of apoptosis by RHDV infection, with increases in both caspase-3 expression/activity and the 85-kDA fragment resulting from PARP-1 proteolysis, and inhibition of different mechanisms

contributing both to the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. Effects reported were abrogated in a dose-dependent manner in RHDV-infected rabbits by melatonin, which thus protected against apoptotic damage in this viral model of FHF (Tuñón *et al.*, 2011a), confirming previous data on the inhibition of apoptotic mechanisms by N-acetyl cysteine in RHDV-treated rabbits (San-Miguel *et al.*, 2006). Although the exact mechanisms that mediate ER stress-induced apoptosis have not yet been elucidated, the mitogen-activated protein kinase JNK, the transcription factor CHOP and caspase-12 activation have all been implicated (Malhi and Kaufman, 2011).

The relationship of ER stress and apoptosis is supported in our study by results from the double immunofluorescence analysis for CHOP and cleaved caspase-3, which demonstrated co-localization of both proteins in liver cells, and by data indicating increased hepatic expression of JNK and caspase-12 in RHDV-infected rabbits. We have shown in a previous study that the activation of JNK is an essential component in liver injury mediated by the RHDV (García-Lastra *et al.*, 2010). JNK activation is required for ER stress-induced apoptosis through at least two mechanisms: induction of Fas and NADPH oxidase (NOX)-2 and subsequent oxidative stress (Li *et al.*, 2010). Caspase-12, normally existing in an inactive procaspase form, dissociates from the ER membrane is cleaved to a fragment, and then activates, initiating downstream apoptotic pathways (Yoneda *et al.*, 2001). It is known that the activation of IRE1 promotes, through recruitment of TRAF2, a cascade of phosphorylation events that ultimately activates JNK and caspase-12 phosphorylation (Mosbah *et al.*, 2010; Malhi and Kaufman, 2011).

Studies using *Chop*-null mice have established the role of CHOP in ER stressinduced apoptosis in a number of disease models (Ji *et al.*, 2005). One of the more widely cited mechanisms of CHOP-induced apoptosis is suppression of the pro-survival protein Bcl-2 (McCullough *et al.*, 2001). Moreover, oxidation of the ER lumen is induced by the CHOP transcriptional target ER oxidase 1α (ERO1 α), promoting a hyperoxidizing environment that leads to cell death (Marciniak *et al.*, 2004).

We have previously reported that melatonin treatment results in reduced oxidative stress and increased expression of Bcl-2 in RHDV-infected rabbits, effects which could be partly related to the now reported inhibition of CHOP expression by this hormone. The fact that CHOP is a transcriptional target not only of ATF4 but also of XBP1 and ATF6 (Tabas and Ron, 2011) provides a possible link among all three branches to increase the intensity of the cell death response in animals with RHDV infection and its inhibition by melatonin treatment.

In summary, melatonin treatment reduces the ER stress and apoptosis in RHDVinfected rabbits. Although complementary studies are required, data from this experimental protocol suggest that the protective effect of melatonin is due not only to its antioxidant, anti-inflammatory, and regenerative effects, but also to the attenuation of the ER stress through the modulation of the three branches of the UPR and to the partial inhibition of apoptosis. Findings from the present study could contribute to the development of new pharmacological strategies to protect livers from FHF injury.

8 CONCLUSIONS

First conclusion

Rabbit hemorrhagic disease virus-infection induces *in vivo* a rapid autophagic response probably with the aim of increasing its viral replication as other positive RNA viruses such as hepatitis C virus and Dengue virus that employ autophagy as an infective strategy. This autophagic process could be used as a host defense mechanism in an attempt to protect the liver from the impending noxious effects of the virus. Direct observation through transmission electron microscopy confirms the increase in the number of autophagic structures. These results are strongly supported by the LC3 hepatocyte labelling and the augmentation in the hepatic expression of the main autophagic markers, such as LC3-II, beclin-1, and the components of the Atg12-Atg5-Atg16L1 complex. These data unequivocally demonstrate that the autophagy was induced in infected rabbits from early infection periods.

Second conclusion

The autophagic mechanism induced by the virus is associated to the endoplasmic reticulum stress response through the activation of the unfolded protein response during the early infection periods. Data obtained show that the expression of three major ER chaperones, BiP/GRP78, CHOP and GRP94 was increased at 24 hpi in parallel to the augmentation observed in the expression of beclin-1 and the components of the two ubiquitin-like systems, Atg12-Atg5-Atg16L1 and LC3. However, in late infection periods, 30 and 36 hpi, while the autophagy declines, PARP-1 proteolysis and caspase-3 activity increase promoting apoptosis as a cell death imminent mechanism to the rapid virus infectivity.

Third conclusion

Melatonin induces a decrease in the autophagy associated to the rabbit hemorrhagic disease virus-infection and inhibits the viral RNA replication. Results revealed a reduction in the antigen VP60 immunoreactivity and a reduction in the relative mRNA expression of the mayor capsid viral protein as well as in the main autophagic markers expression.

Fourth conclusion

Data obtained in this study show a significant reduction in the expression of the main endoplasmic reticulum chaperones beginning at the first infection periods, while the apoptotic markers changes were not observed until the late infection stages.

According to the significance and involvement of both pathways in the autophagy induced by the rabbit hemorrhagic disease virus, the beneficial effects of melatonin could contribute to the development of new pharmacological strategies with the aim of protecting the liver from injury produced in human fulminant hepatic failure.

Final conclusion

Rabbit hemorrhagic disease virus induces a dysfunctional autophagic response during the early infection stages associated to the development of the endoplasmic reticulum stress and apoptosis signaling pathways. Furthermore, throughout the infection course the autophagy decreases and the main apoptotic markers increase, perhaps as a host defense mechanism. Results obtained confirm the protective role of the melatonin in the hepatic injury related to the viral replication, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, apoptosis and autophagy triggered by the virus.

Because fulminant hepatic failure is associated with a high mortality and orthotopic transplantation is not always possible in a timely manner, the inhibition of the endoplasmic reticulum stress, apoptosis, and the reduction in viral replication and autophagic response could be molecular targets for the therapeutic use of melatonin in fulminant hepatic failure, constituting a temporary support while the patient is waiting for transplantation or spontaneous recovery.

9 BIBLIOGRAFÍA

Abounit K, Scarabelli TM, McCauley RB. Autophagy in mammalian cells. *World J Biol Chem* 2012; 3:1-6.

Abrantes J, van der Loo W, Le Pendu J, Esteves PJ. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): A review. *Vet Res* 2012; 43:12.

Acharya SK, Panda SK, Saxena A, Gupta SD. Acute hepatic failure in India: a perspective from the East. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15:473-9.

Aimoto T, Rohde BH, Chiou GC, Lauber JK. N-acetyltransferase activity and melatonin level in the eyes of glaucomatous chickens. *J Ocul Pharmacol* 1985; 1:149-60.

Air-Goughoulte M, Kanda T, Meyer K, Ryerse JS, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus genotype 1a growth and induction of autophagy. *J Virol* 2008; 82:2241-9.

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, *et al.* Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87:171.

Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol* 2012; 32:2-11.

Alonso C, Oviedo JM, Martín-Alonso JM, Diaz E, Boga JA, Parra F. Programmed cell death in the pathogenesis of rabbit hemorrhagic disease. *Arch Virol* 1998; 143:321-32.

Ambriz-Tututi M, Rocha-Gonzalez HI, Cruz SL, Granados-Soto V. Melatonin: a hormone that modulates pain. *Life Sci* 2009; 84:489-98.

Ando K, Moriyama T, Guidotti LG, Wirth S, Schreiber RD, Schlicht HJ, *et al.* Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *J Exp Med* 1993; 178:1541-54.

Antolín I, Rodríguez C, Sainz RM, Mayo JC, Uria H, Kotler ML, *et al*. Neurohormone melatonin prevents cell damage: Effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J* 1996; 10:882-90.

Arendt J. Role of the pineal gland and melatonin in seasonal reproductive function in mammals. *Oxf Rev Reprod Biol* 1986; 8:266-320.

Ariznavarreta C, Cardinali DP, Villanua MA, Granados B, Martín M, Chiesa JJ, et al. Circadian rhythms in airline pilots submitted to longhaul transmeridian flights. Aviat Space Environ Med 2002; 73:445-55.

Armendariz-Borunda J, Katai H, Jones CM, Seyer JM, Kang AH, Raghow R. Transforming growth factor beta gene expression is transiently enhanced at a critical stage during liver regeneration after CCl4 treatment. *Lab Invest* 1993; 69:283-94.

Arroyo V, Fernandez J, Mas A, Escorsell A. Molecular adsorbents recirculating system (MARS) and the failing liver: a negative editorial for a positive trial? *Hepatology* 2008; 47:2143-4.

Arvelo MB, Cooper JT, Longo C, Daniel S, Grey ST, Mahiou J, et al. A20 protects mice from D-galactosamine/lipopolysaccharide acute toxic lethal hepatitis. *Hepatology* 2002; 35:535-43.

Asgari S, Hardy JR, Sinclair RG, Cooke BD. Field evidence for mechanical transmission of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) by flies (Diptera:Calliphoridae) among wild rabbits in Australia. *Virus Res* 1998; 54:123-32.

Ashford TP, Porter KR. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol* 1962; 12:198-202.

Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. Science 1998; 281:1305-8.

Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11:255-60.

Axelrod J. The pineal gland: A neurochemical transducer. Science 1974; 184:1341-8.

Balayan MS. Epidemiology of hepatitis E virus infection. J Viral Hepat 1997; 4:155-65.

Bantel H, Lügering A, Poremba C, Lügering N, Held J, Domschke W, *et al.* Caspase activation correlates with the degree of inflammatory liver injury in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001; 34:758-67.

Bantel H, Ruck P, Schulze-Osthoff K. *In situ* monitoring of caspase activation in hepatobiliary diseases. *Cell Death Differ* 2000; 7:504-5.

Bantel H, Schulze-Osthoff K. Mechanisms of cell death in acute liver failure. *Front Physiol* 2012; 3:79.

Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menéndez-Peláez A, Chen LD, et al. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 1995; 26:497-502.

Barth S, Glick D, Macleod KF. Autophagy: assays and artifacts. J Pathol 2010; 221:117-24.

Basile AS, Jones EA. Ammonia and GABA-ergic neurotransmission: Interrelated factors in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Hepatology* 1997; 25:1303-5.

Belanger M, Butterworth RF. Acute liver failure: A critical appraisal of available animal models. *Metab Brain Dis* 2005; 20:409-23.

Berasain C, García-Trevijano ER, Castillo J, Erroba E, Santamaría M, Lee DC, et al. Novel role for amphiregulin in protection from liver injury. *J Biol Chem* 2005; 280:19012-20.

Berkova Z, Crawford SE, Trugnan G, Yoshimori T, Morris AP, Estes MK. Rotavirus NSP4 induces a novel vesicular compartment regulated by calcium and associated with viroplasms. *J Virol* 2006; 80:6061-71.

Bernal W. Changing patterns of causation and the use of transplantation in the United Kingdom. *Semin Liver Dis* 2003; 23:227-37.

Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, Wendon J. Acute liver failure. *Lancet* 2010; 376:190-201.

Bernal W, Cross TJ, Auzinger G, Sizer E, Heneghan MA, Bowles M, et al. Outcome after waitlisting for emergency liver transplantation in acute liver failure: a single centre experience. *J Hepatol* 2009; 50:306-13.

Bernuau J. Acute liver failure: avoidance of deleterious cofactors and early specific medical therapy for the liver are better than late intensive care for the brain. *J Hepatol* 2004; 41:152-5.

Bernuau J, Durand F. Fulminating and subfulminating hepatic failure, emergency of prevention. *Gastroenterol Clin Biol* 1997; 21:387-90.

Bernuau J, Rueff B, Benhamou JP. Fulminant and subfulminant liver failure: definitions and causes. *Semin Liver Dis* 1986; 6:97-106.

Bihari DJ, Gimson AE, Williams R. Cardiovascular, pulmonary and renal complications of fulminant hepatic failure. *Semin Liver Dis* 1986; 6:119-28.

Bilir BM, Guinette D, Jarrer F, Kumpe DA, Krysl J, Stephens J, et al. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl* 2000; 6:32-40.

Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 2005; 171:603-14.

Blanchet FP, Moris A, Nikolic DS, Lehmann M, Cardinaud S, Stalder R, *et al.* Human immunodeficiency virus-1 inhibition of immunoamphisomes in dendritic cells impairs early innate and adaptive immune responses. *Immunity* 2010; 32:654-69.

Blei AT. Brain edema in acute liver failure. Crit Care Clin 2008; 24:99,114, ix.

Boga JA, Coto-Montes A, Rosales-Corral SA, Tan DX, Reiter RJ. Beneficial actions of melatonin in the management of viral infections: a new use for this "molecular handyman"? *Rev Med Virol* 2012; 22:323-38.

Boks AL, Brommer EJ, Schalm SW, Van Vliet HH. Hemostasis and fibrinolysis in severe liver failure and their relation to hemorrhage. *Hepatology* 1986; 6:79-86.

Boniotti B, Wirblich C, Sibilia M, Meyers G, Thiel HJ, Rossi C. Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus. *J Virol* 1994; 68:6487-95.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.

Bubenik GA. Localization of melatonin in the digestive tract of the rat. Effect of maturation, diurnal variation, melatonin treatment and pinealectomy. *Horm Res* 1980; 12:313-23.

Bustos M, Beraza N, Lasarte JJ, Baixeras E, Alzuguren P, Bordet T, *et al.* Protection against liver damage by cardiotrophin-1: A hepatocyte survival factor upregulated in the regenerating liver in rats. *Gastroenterology* 2003; 125:192-201.

Calvo JR, González-Yanes C, Maldonado MD. The role of melatonin in the cells of the innate immunity: a review. *J Pineal Res* 2013; 55:103-20.

Campbell JS, Prichard L, Schaper F, Schmitz J, Stephenson-Famy A, Rosenfeld ME, *et al.* Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration. *J Clin Invest* 2001; 107:1285-92.

Cancellotti FM, Renzi M. Epidemiology and current situation of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome in Italy. *Rev Sci Tech* 1991, 10:409-22.

Capucci L, Scicluna MT, Lavazza A. Diagnosis of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev Sci Tech* 1991; 10:347-70.

Caraceni P, Van Thiel DH. Acute liver failure. Lancet 1995; 345:163-9.

Carman JA, Garner MG, Catton MG, Thomas S, Westbury HA, Cannon RM, et al. Viral haemorrhagic disease of rabbits and human health. *Epidemiol Infect* 1998; 121:409-18.

Carpenter JE, Jackson W, Benetti L, Grose C. Autophagosome formation during varicella-zoster virus infection following endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *J Virol* 2011; 45:1914-24.

Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 2005a; 27:189-200.

Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Fernández-Santos JM, Martín-Lacave I, Calvo JR, Karasek M, et al. Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system. *J Clin Endocrinol Metab* 2005b; 90:992-1000.

Cassone VM, Chesworth MJ, Armstrong SM. Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiol Behav* 1986; 36:1111-21.

Chang CF, Huang HJ, Lee HC, Hung KC, Wu RT, Lin AM. Melatonin attenuates kainic acidinduced neurotoxicity in mouse hippocampus via inhibition of autophagy and α -synuclein aggregation. *J Pineal Res* 2012; 52:312-21.

Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: Functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64:821-46.

Chaumorcel M, Souquere S, Pierron G, Codogno P, Esclatine A. Human cytomegalovirus controls a new autophagy-dependent cellular antiviral defense mechanism. *Autophagy* 2008; 4:46-53.

Chen L, Liu G, Ni Z, Yu B, Yun T, Song Y, et al. Minor structural protein VP2 in rabbit hemorrhagic disease virus downregulates the expression of the viral capsid protein VP60. *J Gen Virol* 2009; 90:2952-5.

Chen L, Ren F, Zhang H, Wen T, Piao Z, Zhou L, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase 3β ameliorates D-GalN/LPS-induced liver injury by reducing endoplasmic reticulum stress-triggered apoptosis. *PLoS One* 2012; 7:e45202.

Chen Z, Ding YT. Functional evaluation of a new bioartificial liver system *in vitro* and *in vivo*. *World J Gastroenterol* 2006; 12:1312-6.

Choi SI, Kim KS, Oh JY, Jin JY, Lee GH, Kim EK. Melatonin induces autophagy via an mTOR-dependent pathway and enhances clearance of mutant-TGFBIp. *J Pineal Res* 2012; 54:361-72.

Clark SL Jr. Cellular differentiation in the kidneys of new born mice studies with the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol* 1957; 3:349-62.

Clemmesen JO, Larsen FS, Kondrup J, Hansen BA, Ott P. Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* 1999; 29:648-53.

Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res* 2000; 28:193-202.

Cooke BD. Rabbit haemorrhagic disease: field epidemiology and the management of wild rabbit populations. *Rev Sci Tech* 2002; 21:347-58.

Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* 1941; 47:200-2.

Córdoba J. Treatment of hepatic encephalopathy. Gastroenterol Hepatol 2002; 25:7-14.

Córdoba J, Crespin J, Gottstein J, Blei AT. Mild hypothermia modifies ammoniainduced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Gastroenterology* 1999; 116:686-93.

Crawford SE, Hyser JM, Utama B, Estes MK. Autophagy hijacked through viroporin-activated calcium/calmodulin-dependent kinase kinase- β signalling is required for rotavirus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:E3405-13.

Crespo I, García-Mediavilla MV, Almar M, González P, Tuñón MJ, Sanchez-Campos S, et al. Differential effects of dietary flavonoids on reactive oxygen and nitrogen species generation and changes in antioxidant enzyme expression induced by proinflammatory cytokines in chang liver cells. *Food Chem Toxicol* 2008; 46:1555-69.

Crespo I, San-Miguel B, Laliena A, Álvarez M, Culebras JM, González-Gallego J, et al. Melatonin prevents the decreased activity of antioxidant enzymes and activates nuclear erythroid 2-related factor 2 signaling in an animal model of fulminant hepatic failure of viral origin. *J Pineal Res* 2010; 49:193-200.

Crespo I, San Miguel B, Prause C, Marroni N, González-Gallego J, Tuñón MJ. Glutamine treatment attenuates endoplasmic reticulum stress and apoptosis in TNBS-induced colitis. *PLoS One* 2012; 7:e50407.

Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off. Trends *Endocrinol Metab* 2010; 21:142-50.

Czaja AJ. Acute and acute severe (fulminant) autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 2013; 58:897-914.

Dalton HR, Fellows HJ, Stableforth W, Joseph M, Thurairajah PH, Warshow U, et al. The role of hepatitis E virus testing in drug-induced liver injury. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26:1429-35.

David R. Apoptosis: A lipid trigger of MOMP. Nat Rev Mol Cell Biol 2012; 13:208-9.

de Haan CA, Reggiori F. Are nidoviruses hijacking the autophagy machinery? *Autophagy* 2008; 4:276-9.

de la Mata M, Meager A, Rolando N, Daniels HM, Nouri-Aria KT, Goka AK, *et al.* Tumour necrosis factor production in fulminant hepatic failure: Relation to aetiology and superimposed microbial infection. *Clin Exp Immunol* 1990; 2:479-84.

Deacon S, Arendt J. Melatonin-induced temperature suppression and its acute phaseshifting effects correlate in a dose-dependent manner in humans. *Brain Res* 1995; 88:77-85.

Delibes-Mateos M, Redpath SM, Angulo E, Ferreras P, Villafuerte R. Rabbits as a keystone species in southern Europe. *Biol Conserv* 2007; 137:149-56.

Dempsey RJ, Kindt GW. Experimental acute hepatic encephalopathy: Relationship of pathological cerebral vasodilation to increased intracranial pressure. *Neurosurgery* 1982; 10:737-41.

Deretic V, Levine B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe* 2009; 5:527-49.

Deter RL, De Duve C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol* 1967; 33:437-49.

Detry O, Arkadopoulos N, Ting P, Kahaku E, Watanabe FD, Rozga J, et al. Intracranial pressure during liver transplantation for fulminant hepatic failure. *Transplantation* 1999; 67:767-70.

Detry O, Gaspar Y, Cheramy-Bien JP, Drion P, Meurisse M, Defraigne JO. A modified surgical model of fulminant hepatic failure in the rat. *J Surg Res* 2013; 181:85-90.

Devauchelle P, Page M, Brun P, Ber CE, Crozon J, Baillon JJ, *et al.* Continuous haemodialysis with citrate anticoagulation in patients with liver failure: three cases. *Ann Fr Anesth Reanim* 2012; 31:543-6.

Devereaux K, Dall'Armi C, Alcazar-Roman A, Ogasawara Y, Zhou X, Wang F, et al. Regulation of mammalian autophagy by class II and III PI 3-kinases through PI3P synthesis. *PLoS One* 2013; 8:e76405.

Ding JW, Ning Q, Liu MF, Lai A, Leibowitz J, Peltekian KM, *et al*. Fulminant hepatic failure in murine hepatitis virus strain 3 infection: Tissue-specific expression of a novel fgl2 prothrombinase. *J Virol* 1997; 71:9223-30.

Ding WX, Ni HM, Gao W, Yoshimori T, Stolz DB, Ron D, et al. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol* 2007; 45:513-24.

Doggrell SA. Suramin: Potential in acute liver failure. *Expert Opin Investig Drugs* 2004; 13:1361-3.

Doria C, Nicotra G, D'Antona GM, Travali S, Messina A, Marino I, *et al.* Prognostic index of acute hepato-cellular damage. *Ann Ital Chir* 2007; 78:169-76.

Dreux M, Chisari FV. Viruses and the autophagy machinery. *Cell Cycle* 2010; 9:1295-307.

Dreux M, Chisari FV. Autophagy proteins promote hepatitis C virus replication. *Autophagy* 2009; 5:1224-5.

Dreux M, Gastaminza P, Wieland SF, Chisari FV. The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:14046-51.

Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005; 27:101-10.

Duff JP, Chasey D, Munro R, Wooldridge M. European brown hare syndrome in England. *Vet Rec* 1994; 134:669-73.

Eguchi S, Lilja H, Hewitt WR, Middleton Y, Demetriou AA, Rozga J. Loss and recovery of liver regeneration in rats with fulminant hepatic failure. *J Surg Res* 1997; 72:112-22.

Eichhorst ST. Modulation of apoptosis as a target for liver disease. *Expert Opin Ther Targets* 2005; 9:83-99.

Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomed Pharmacother* 2006; 60: 97-108.

El Bassiouny AE, El-Bassiouni NE, Nosseir MM, Zoheiry MM, El-Ahwany EG, Salah F, et al. Circulating and hepatic fas expression in HCV-induced chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Medscape J Med* 2008; 10:130.

Ellis A, Wendon J. Circulatory, respiratory, cerebral, and renal derangements in acute liver failure: pathophysiology and management. *Semin Liver Dis* 1996; 16:379-388.

Escames G, Acuna-Castroviejo D, López LC, Tan DX, Maldonado MD, Sánchez-Hidalgo M, et *al.* Pharmacological utility of melatonin in the treatment of septic shock: Experimental and clinical evidence. *J Pharm Pharmacol* 2006; 58:1153-65.

Eskelinen EL, Reggiori F, Baba M, Kovács AL, Seglen PO. Seeing is believing: the impact of electron microscopy on autophagy research. *Autophagy* 2011; 7:935-56.

Esteves PJ, Abrantes J, Carneiro M, Müller A, Thompson G , van der Loo W. Detection of positive selection in the major capsid protein VP60 of the rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *Virus Res* 2008; 137:253-6.

Fábrega E, Mieses MÁ, Terán A, Moraleja I, Casafont F, Crespo J, et al. Etiologies and outcomes of acute liver failure in a spanish community. *Int J Hepatol* 2013; 2013:928960.

Fenner F. Deliberate introduction of the European rabbit, Oryctolagus cuniculus, into Australia. *Rev Sci Tech* 2010; 29:103-11.

Feranchak AP, Tyson RW, Narkewicz MR, Karrer FM, Sokol RJ. Fulminant Epstein-Barr viral hepatitis: orthotopic liver transplantation and review of the literature. *Liver Transpl Surg* 1998; 4:469-76.

Ferraris P, Blanchard E, Roingeard P. Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *J Gen Virol* 2010; 91:2230-7.

Filippi C, Dhawan A. Current status of human hepatocyte transplantation and its potential for Wilson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2014; 1315:50-5.

Filipponi F, Boggi U, Meacci L, Burchielli S, Vistoli F, Bellini R, *et al.* A new technique for total hepatectomy in the pig for testing liver support devices. *Surgery* 1999; 125:448-55.

Filipponi F, Fabbri LP, Marsili M, Falcini F, Benassai C, Nucera M, *et al.* A new surgical model of acute liver failure in the pig: Experimental procedure and analysis of liver injury. *Eur Surg Res* 1991; 23:58-64.

Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di Bartolomeo S, Nardacci R, et al. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* 2007; 447:1121-5.

Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 2003; 10:76-100.

Frühauf NR, Oldhafer KJ, Westermann S, Sotiropoulos GC, Kaiser GM. Acute hepatic failure in swine: hepatectomy versus vascular occlusion. *J Invest Surg* 2004; 17:163-71.

Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell* 2008; 19:2092-100.

Fujiwara Y, Furuta A, Kikuchi H, Aizawa S, Hatanaka Y, Konya C, et al. Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. *Autophagy* 2013a; 9:403-9.

Fujiwara Y, Kikuchi H, Aizawa S, Furuta A, Hatanaka Y, Konya C, et al. Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes. Autophagy 2013b; 9:1167-71.

Fukuda M, Itoh T. Direct link between Atg protein and small GTPase Rab: Atg16L functions as a potential Rab33 effector in mammals. *Autophagy* 2008; 4:824-6.

Fukueda M, Ishizaki N, Hamada N, Kadono J, Kaieda M, Nakamura N, et al. Porcine model of auxiliary partial orthotopic liver transplantation for acute liver failure. *Transplantation* 2006; 82:1312-8.

Gannagé M, Dormann D, Albrecht R, Dengjel J, Torossi T, Rämer PC, *et al.* Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe* 2009; 6:367-80.

García MA, Gil J, Ventoso I, Guerra S, Domingo E, Rivas C, *et al.* Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 70:1032-60.

García-Lastra R, San Miguel B, Crespo I, Jorquera F, Álvarez M, González Gallego J, et al. Signaling pathways envolved in liver injury and regeneration in Rabbit hemorrhagic disease, an animal model of virally-induced fulminant hepatic failure. *Vet Res* 2010; 41:2.

García-Martínez JM, Alessi DR. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J* 2008; 416:375-85.

Gardner BM, Walter P. Unfolded proteins are IRE1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* 2011; 333:1891-4.

Gaut JR, Hendershot LM. The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5:589-95.

Germani G, Theocharidou E, Adam R, Karam V, Wendon J, O'Grady J, et al. Liver transplantation for acute liver failure in Europe: Outcomes over 20years from the ELTR database. *J Hepatol* 2012; 57:288-96.

Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 2010; 221:3-12.

Gorman AM, Healy SJ, Jäger R, Samali A. Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacol Ther* 2012; 134:306-16.

Gould AR, Kattenbelt JA, Lenghaus C, Morrissy C, Chamberlain T, Collins BJ, et al. The complete nucleotide sequence of rabbit haemorrhagic disease virus (Czech strain V351): use of the polymerase chain reaction to detect replication in Australian vertebrates and analysis of viral population sequence variation. *Virus Res* 1997; 47:7-17.

Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy and cell death. Curr Top Dev Biol 2007; 78:217-45.

Grace MS, Cahill GM, Besharse JC. Melatonin deacetylation: Retinal vertebrate class distribution and xenopus laevis tissue distribution. *Brain Res* 1991; 559:56-63.

Granzow H, Weiland F, Strebelow HG, Liu CM, Schirrmeier H. Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV): Ultrastructure and biochemical studies of typical and core-like particles present in liver homogenates. *Virus Res* 1996; 41:163-72.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. Science 1998; 281:1309-12.

Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, et al. Taxonomy of the caliciviruses. J Infect Dis 2000; 181:S322-30.

Gregg DA, House C, Meyer R, Berninger M. Viral haemorrhagic disease of rabbits in Mexico: epidemiology and viral characterization. *Rev Sci Tech* 1991; 10:435-51.

Gregus Z, Madhu C, Klaasen CD. Species variation in toxication and detoxication of acetaminophen *in vivo*: a comparative study of biliary and urinary excretion of acetaminophen metabolites. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 244:91-9.

Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem* 2002; 2:167-79.

Gunawan BK, Liu ZX, Han D, Hanawa N, Gaarde WA, Kaplowitz N. c-Jun N-terminal kinase plays a major role in murine acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* 2006; 131:165-78.

Guo Y, Wang J, Wang Z, Yang Y, Wang X, Duan Q. Melatonin protects N2a against ischemia/reperfusion injury through autophagy enhancement. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2010; 30:1-7.

Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, *et al.* Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* 2013; 495:389-93.

Han D, Lerner AG, Vande Walle L, Upton JP, Xu W, Hagen A, *et al.* IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell* 2009; 138:562-75.

Hardeland R. Melatonin in aging and disease -multiple consequences of reduced secretion, options and limits of treatment. *Aging Dis* 2012; 3:194-225.

Hardeland R. Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *Biofactors* 2009; 35:183-92.

Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more: Occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:2001-18.

Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17:347-57.

Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 2000; 5:897-904.

Harrison PM, Wendon JA, Gimson AE, Alexander GJ, Williams R. Improvement by acetylcysteine of hemodynamics and oxygen transport in fulminant hepatic failure. *N Engl J Med* 1991; 324:1852-7.

Hashimoto K, Minagawa H, Yanagi Y. Caspase-dependent apoptosis in fulminant hepatic failure induced by herpes simplex virus in mice. *J Hepatol* 2003; 39:773-8.

Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 1999; 10:3787-99.

He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009; 43:67-93.

He Y, Zhou J, Dou KF, Chen Y. A rat model for acute hepatic failure. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2:423-5.

Henrion J. Hypoxic hepatitis. Liver Int. 2012; 32:1039-52.

Hessel F, Grabein K, Schnell-Inderst P, Siebert U, Caspary W, Wasem J. Extracorporal hemodialysis with acute or decompensated chronical hepatic failure. *GMS Health Technol Assess* 2006; 2:Doc08.

Hetz C, Bernasconi P, Fisher J, Lee AH, Bassik MC, Antonsson B, *et al.* Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science* 2006; 312:572-6.

Hetz C, Martinon F, Rodriguez D, Glimcher LH. The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1α. *Physiol Rev* 2011; 91:1219-43.

Hikita H, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Shigekawa M, Hosui A, *et al.* Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bak/Bax-deficient mice. *Hepatology* 2011; 54:240-51.

Hinson JA, Roberts DW, James LP. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb Exp Pharmacol* 2010; 196:369-405.

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976; 74:214-26.

Hong RT, Xu JM, Mei Q. Melatonin ameliorates experimental hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *World J Gastroenterol* 2009; 15:1452-8.

Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, *et al.* Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* 2009; 20:1981-91.

Hsu SY, Kaipia A, Zhu L, Hsueh AJ. Interference of BAD (Bcl-xL/Bcl-2-associated death promoter)-induced apoptosis in mammalian cells by 14-3-3 isoforms and P11. *Mol Endocrinol* 1997; 11:1858-67.

Hu S, Yin S, Jiang X, Huang D, Shen G. Melatonin protects against alcoholic liver injury by attenuating oxidatives stress, inflammation response, and apoptosis. *Eur J Pharmacol* 2009; 616:287-92.

Huang H, Kang R, Wang J, Luo G, Yang W, Zhao Z. Hepatitis C virus inhibits AKT-tuberous sclerosis complex (TSC), the mechanistic target of rapamycin (MTOR) pathway, through endoplasmic reticulum stress to induce autophagy. *Autophagy* 2013a; 9:175-95.

Huang J, Lam GY, Brumell JH. Autophagy signaling through reactive oxygen species. Antiox Redox Signal 2011; 14:2215-31.

Huang S, Okamoto K, Yu C, Sinicrope FA. p62/sequestosome-1 upregulation promotes ABT-263-induced caspase-8 aggregation/activation on the autophagosome. *J Biol Chem* 2013b; 45:33654-66.

Huang SC, Chang CL, Wang PC, Tsai Y, Liu Hs. Enterovirus 71-induced autophagy detected *in vitro* and *in vivo* promotes viral replication. *J Med Virol* 2009; 81:1241-52.

Huether G, Poeggeler B, Reimer A, George A. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: Evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci* 1992; 51:945-53.

Ichaï P, Saliba F. Fulminant and subfulminant hepatitis: causes and treatment. *Presse Med* 2009; 38:1290-8.

Ichai P, Samuel D. Etiology and prognosis of fulminant hepatic hepatitis in adults. *Liver transpl* 2011; 14:S67-79.

Itakura E, Mizushima N. Atg14 and UVRAG: mutually exclusive subunits of mammalian Beclin 1-PI3K complexes. *Autophagy* 2009; 5:534-6.

Itoh MT, Ishizuka B, Kudo Y, Fusama S, Amemiya A, Sumi Y. Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase activities in rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 136:7-13.

Jackson WT, Giddings TH Jr, Taylor MP, Mulinyawe S, Rabinovitch M, Kopito RR, *et al.* Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol* 2005; 3:156.

Jalan R. Acute liver failure: Current management and future prospects. *J Hepatol* 2005; 42:S115-23.

Jaryal AK. The Nobel Prize in physiology or medicine for the year 2002. *Indian J Physiol Pharmacol* 2003; 47:236-7.

Jayanthi V, Udayakumar N. Acute liver failure in pregnancy: an overview. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2008; 54:75-84.

Jeong JK, Moon MH, Lee YJ, Seol JW, Park SY. Melatonin-induced autophagy protects against human prion protein-mediated neurotoxicity. *J Pineal Res* 2012; 53:138-46.

Ji C, Mehrian-Shai R, Chan C, Hsu YH, Kaplowitz N. Role of CHOP in hepatic apoptosis in the murine model of intragastric ethanol feeding. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29:1496-1503.

Jia C, Dai C, Bu X, Peng S, Xu F, Xu Y, *et al.* Co-administration of prostaglandin E1 with somatostatin attenuates acute liver damage after massive hepatectomy in rats via inhibition of inflammatory responses, apoptosis and endoplasmic reticulum stress. *Int J Mol Med* 2013; 31:416-22.

Jiang H, White EJ, Ríos-Vicil CI, Xu J, Gómez-Manzano C, Fueyo J. Human adenovirus type 5 induces cell lysis through autophagy and autophagytriggered caspase activity. *J Virol* 2011; 85:4720-9.

Jiang N, Zhang X, Zheng X, Chen D, Siu K, Wang H, *et al.* A novel *in vivo* siRNA delivery system specifically targeting liver cells for protection of ConA-induced fulminant hepatitis. *PLoS One* 2012; 7:e44138.

Jiménez-Jorge S, Jiménez-Caliani AJ, Guerrero JM, Naranjo MC, Lardone PJ, Carrillo-Vico A, *et al*. Melatonin synthesis and melatonin-membrane receptor (MT1) expression during rat thymus development: role of the pineal gland. *J Pineal Res* 2005; 39:77-83.

Jin R, Zhu W, Cao S, Chen R, Jin H, Liu Y, *et al.* Japanese encephalitis virus activates autophagy as a viral immune evasion strategy. *PLoS One* 2013; 45:e52909.

Jin X, von Gall C, Pieschl RL, Gribkoff VK, Stehle JH, Reppert SM, *et al.* Targeted disruption of the mouse mel(1b) melatonin receptor. *Mol Cell Biol* 2003; 23:1054-60.

Jin Z, Li Y, Pitti R, Lawrence D, Pham VC, Lill JR, *et al.* Cullin 3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell* 2009; 45:729-35.

Joubert PE, Werneke SW, de la Calle C, Guivel-Benhassine F, Giodini A, Peduto L, et al. Chikungunya virus-induced autophagy delays caspase-dependent cell death. *J Exp Med* 2012; 209:1029-47.

Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. FEBS Lett 2010; 584:1287-95.

Jung JY, Lee BJ, Tai JH, Park JH, Lee YS. Apoptosis in rabbit haemorrhagic disease. J Comp Pathol 2000; 123:135-40.

Jung Y, Oh SH, Witek RP, Petersen BE. Somatostatin stimulates the migration of hepatic oval cells in the injured rat liver. *Liver Int* 2012; 32:312-20.

Kaita KD, Assy N, Gauthier T, Zhang M, Meyers AF, Minuk GY. The beneficial effects of ciprofloxacin on survival and hepatic regenerative activity in a rat model of fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1998; 27:533-6.

Kantola T, Ilmakunnas M, Koivusalo AM, Isoniemi H. Bridging therapies and liver transplantation in acute liver failure, 10 years of MARS experience from Findland. *Scand J Surg* 2011; 100:8-13.

Ke PY, Chen SS. Hepatitis C virus and cellular stress response: implications to molecular pathogenesis of liver diseases. *Viruses* 2012; 4:2251-90.

Ke PY, Chen SS. Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *J Clin Invest* 2011; 121:37-56.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-57.

Khan SA, Shah N, Williams R, Jalan R. Acute liver failure: A review. *Clin Liver Dis* 2006; 10:239-58.

Khuu DN, Nyabi O, Maerckx C, Sokal E, Najimi M. Adult human liver mesenchymal stem/progenitor cells participate in mouse liver regeneration after hepatectomy. *Cell Transplant* 2013; 22:1369-80.

Kim KM, Kim YM, Park M, Park K, Chang HK, Park TK, *et al.* A broadspectrum caspase inhibitor blocks concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Clin Immunol* 2000; 97:221-33.

Kim SH, Lee SM. Cytoprotective effects of melatonin against necrosis and apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury in rat liver. *J Pineal Res* 2008; 44:165-71.

Kirkegaard K, Taylor MP, Jackson WT. Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2:301-14.

Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, *et al.* The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res* 1997; 52:307-57.

Kleinschmidt-DeMasters BK, Prayson RA. An algorithmic approach to the brain biopsy--part I. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130:1630-8.

Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:931-7.

Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012; 8:445-544.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275:1132-6.

Kobayashi H, Kromminga A, Dunlop TW, Tychsen B, Conrad F, Suzuki N, et al. A role of melatonin in neuroectodermal-mesodermal interactions: the hair follicle synthesizes melatonin and expresses functional melatonin receptors. *FASEB J* 2005; 19:1710-2.

Kolar J, Machackova I. Melatonin in higher plants: occurrence and possible functions. J Pineal Res 2005; 39:333-41.

Konig M, Thiel HJ, Meyers G. Detection of viral proteins after infection of cultured hepatocytes with rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol* 1998; 72:4492-7.

Kosenko E, Kaminsky Y, Kaminsky A, Valencia M, Lee L, Hermenegildo C, et al. Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. *Free Radic Res* 1997; 27:637-44.

Kosenko E, Venediktova N, Kaminsky Y, Montoliu C, Felipo V. Sources of oxygen radicals in brain in acute ammonia intoxication *in vivo*. *Brain Res* 2003; 981:193-200.

Koster-van Hoffen GC, Mirmiran M, Bos NP, Witting W, Delagrange P, Guardiola-Lemaitre B. Effects of a novel melatonin analog on circadian rhythms of body temperature and activity in young, middle-aged, and old rats. *Neurobiol Aging* 1993; 14:565-9.

Kotler M, Rodríguez C, Saínz RM, Antolín I, Menéndez-Peláez A. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J Pineal Res* 1998; 24:83-9.

Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H, et al. ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ* 2007; 14:230-9.

Kraft C, Martens S. Mechanisms and regulation of autophagosome formation. *Curr Opin Cell Biol*. 2012; 24:496-501.

Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell Death Differ* 2005; 12:1463-7.

Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 2010; 40: 280-93.

Kudchodkar SB, Levine B. Viruses and autophagy. Rev Med Virol 2009; 19:359-78.

Kurus M, Esrefoglu M, Sogutlu G, Atasever A. Melatonin prevents cyclosporine-induced hepatotoxicity in rats. *Med Princ Pract* 2009; 18:407-10.

Kyei GB, Dinkins C, Davis AS, Roberts E, Singh SB, Dong C, *et al.* Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J Cell Biol* 2009; 186:255-68.

Ladurner R, Hochleitner B, Schneeberger S, Barnas U, Krismer A, Kleinsasser A, *et al.* Extended liver resection and hepatic ischemia in pigs: A new, potentially reversible model to induce acute liver failure and study artificial liver support systems. *Eur Surg Res* 2005; 37:365-9.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.

Laliena A, San-Miguel B, Crespo I, Álvarez M, González-Gallego J, Tuñón MJ. Melatonin attenuates inflammation and promotes regeneration in rabbits with fulminant hepatitis of viral origin. *J Pin Res* 2012; 53:270-8.

Langnas AN, Markin RS, Cattral MS, Naides SJ. Parvovirus B19 as a possible causative agent of fulminant liver failure and associated aplastic anemia. *Hepatology* 1995; 22:1661-5.

Lavazza A, Capucci L. How many caliciviruses are there in rabbits? A review on RHDV and correlated Viruses. En: *Lagomorph Biology* 2008; pp:263-78.

Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling. *Biochem J* 2012; 441:523-40.

Lee WM. Acute liver failure. Semin Respir Crit Care Med. 2012; 33:36-45.

Lee WM. Management of acute liver failure. Semin Liver Dis 1996; 16:369-78.

Lee WM. Acute liver failure. N Engl J Med 1993; 329:1862-72.

Lee WM, Squires Jr RH, Nyberg SL, Doo E, Hoofnagle JH. Acute liver failure: summary of a workshop. *Hepatology* 2008; 47:1401-15.

Lee YR, Hu HY, Kuo SH, Lei HY, Lin YS, Yeh TM, *et al.* Dengue virus infection induces autophagy: an *in vivo* study. *J Biomed Sci* 2013; 20:65.

Lee YR, Lei HY, Liu MT, Wang JR, Chen SH, Jiang-Shieh YF, *et al.* Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. *Virology* 2008; 374:240-8.

Leifeld L, Fink K, Debska G, Fielenbach M, Schmitz V, Sauerbruch T, et al. Antiapoptotic function of gelsolin in fas antibody-induced liver failure *in vivo*. *Am J Pathol* 2006; 168:778-85.

Lerner LJ, Holthaus FJ, Thompson CR. A non-steroidal estrogen antiagonist 1-(p-2diethylaminoethoxyphenyl)-1-phenyl-2-p-methoxyphenyl ethanol. *Endocrinology* 1958; 63:295-318.

Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulador of apoptosis and autophagy. *Autophagy* 2008; 4:600-6.

Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 2005; 115:2679-88.

Lewy AJ, Wehr TA, Goodwin FK, Newsome DA, Markey SP. Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science* 1980; 210:1267-9.

Li G, Scull C, Ozcan L, Tabas I. NADPH oxidase links endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and PKR activation to induce apoptosis. *J Cell Biol* 2010; 191:1113-25.

Li J, Ni M, Lee B, Barron E, Hinton DR, Lee AS. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell Death Differ* 2008; 15:1460-71.

Li L, Wang L, Xiao R, Zhu G, Li Y, Liu C, *et al*. The invasion of tobacco mosaic virus RNA induces endoplasmic reticulum stress-related autophagy in HeLa cells. *Biosci Rep* 2012; 45:171-84.

Liang TJ, Jeffers LJ, Reddy KR, De Medina M, Parker IT, Cheinquer H, *et al.* Viral pathogenesis of hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 1993; 18:1326-33.

Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, et al. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol* 1998; 72:8586-96.

Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen WR, Zhang C, Panning B, *et al.* IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* 2007; 318:944-9.

Liu G, Ni Z, Yun T, Yu B, Chen L, Zhao W, *et al.* A DNA-launched reverse genetics system for rabbit hemorrhagic disease virus reveals that the VP2 protein is not essential for virus infectivity. *J Gen Virol* 2008; 89:3080-5.

Liu SJ, Xue HP, Pu BQ, Qian NH. A new viral disease in rabbit. *Anim Husb Vet Med* 1984; 16:253-5.

López-Vázquez A, Martín-Alonso JM, Casais R, Boga JA, Parra F. Expression of enzymatically active rabbit hemorrhagic disease virus RNA-dependent RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Virol* 1998; 72:2999-3004.

Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K. The role of caspases in development, immunity and apoptotic signal transduction: lessons from knock-out mice. *Immunity* 1999; 10:629-39.

Luedde T, Liedtke C, Manns MP, Trautwein C. Losing balance: cytokine signaling and cell death in the context of hepatocyte injury and hepatic failure. *Eur Cytokine Netw* 2002; 13:377-83.

Machín A, Martín-Alonso JM, Parra F. Identification of the amino acid residue involved in rabbit hemorrhagic disease virus VPg uridylylation. *J Biol Chem* 2001; 276:27787-92.

Maier HJ, Britton P. Involvement of autophagy in coronavirus replication. *Viruses* 2012; 4:3440-51.

Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, *et al*. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* 2007a; 26:2527-39.

Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2007b; 8:741-52.

Makino H, Togo S, Kubota T, Morioka D, Morita T, Kobayashi T, *et al*. A good model of hepatic failure after excessive hepatectomy in mice. *J Surg Res* 2005; 127:171-6.

Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006; 43:S31-44.

Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. J Hepatol 2011; 54:795-809.

Malhotra JD, Kaufman RJ. The Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18:716-31.

Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, *et al.* FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle *in vivo*. *Cell Metab* 2007; 6:458-71.

Mann FC. Studies in the physiology of the liver: I. Technique and general effects of removal. *Am J Med Sci* 1921; 161:37-42.

Mao Y, Da L, Tang H, Yang J, Lei Y, Tiollais P, et al. Hepatitis B virus X protein reduces starvation-induced cell death through activation of autophagy and inhibition of mitochondrial apoptotic pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 45:68-74.

Marcato PS, Benazzi C, Vecchi G, Galeotti M, Della Salda L, Sarli G, et al. Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev Sci Tech* 1991; 10:371-92.

Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, *et al.* CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 2004; 18:3066-77.

Marquès JM, Belza I, Holtmann B, Pennica D, Prieto J, Bustos M. Cardiotrophin-1 is an essential factor in the natural defense of the liver against apoptosis. *Hepatology* 2007; 45:639-48.

Marques RM, Costa-E-Silva A, Aguas AP, Teixeira L, Ferreira PG. Early acute depletion of lymphocytes in calicivirus-infected adult rabbits. *Vet Res Commun* 2010; 34:659-68.

Martín-Renedo J, Mauriz JL, Jorquera F, Ruiz-Andrés O, González P, González-Gallego J. Melatonin induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cell line. *J Pineal Res* 2008; 45:532-40.

Mas A, Escorsell A, Fernández J. Liver transplantation for acute liver failure: A Spanish perspective. *Transplant Proc* 2010; 42:619-21.

Mas A, Rodés J. Fulminant hepatic failure. Lancet 1997; 349:1081-5.

Master S, Gottstein J, Blei AT. Cerebral blood flow and the development of ammoniainduced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology* 1999; 30:876-80.

Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, *et al.* Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009; 45:1062-75.

Mauriz JL, González P, Jorquera F, Olcoz JL, González-Gallego J. Caspase inhibition does not protect against liver damage in hemorrhagic shock. *Shock* 2003; 19:33-7.

Mauriz JL, Molpeceres V, García-Mediavilla MV, González P, Barrio JP, González-Gallego J. Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats. *J Pineal Res* 2007; 42:222-30.

Mauriz JL, Tuñón MJ, González-Gallego J. Apoptotic signaling pathways as a target for the treatment of liver diseases. *Mini Rev Med Chem* 2008; 8:1485-93.

Mayo JC, Sainz RM, Antoli I, Herrera F, Martín V, Rodríguez C. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59:1706-13.

Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C, et al. Antiinflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol* 2005; 165:139-49.

McAlpine F, Williamson LE, Tooze SA, Chan EY. Regulation of nutrient-sensitive autophagy by uncoordinated 51-like kinases 1 and 2. *Autophagy* 2013; 9:361-73.

McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 2001; 21:1249-59.

McPhail MJ, Bajaj JS, Thomas HC, Taylor-Robinson SD. Pathogenesis and diagnosis of hepatic encephalopathy. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 4:365-78.

Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res* 2010; 20:748-62.

Meng C, Zhou Z, Jiang K, Yu S, Jia L, Wu Y, *et al*. Newcastle disease virus triggers autophagy in U251 glioma cells to enhance virus replication. *Arch Virol* 2012; 45:1011-8.

Mercer CA, Kaliappan A, Dennis PB. A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy* 2009; 5:649-62.

Meyers G. Translation of the minor capsid protein of a calicivirus is initiated by a novel termination-dependent reinitiation mechanism. *J Biol Chem* 2003; 278:34051-60.

Meyers G, Stoll D, Gunn M. Insertion of a sequence encoding light chain 3 of microtubuleassociated proteins 1A and 1B in a pestivirus genome: connection with virus cytopathogenicity and induction of lethal disease in cattle. *J Virol* 1998; 72:4139-48.

Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ. Rabbit hemorrhagic disease virus--molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology* 1991; 184:664-76.

Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ, Thumfart JO. Rabbit hemorrhagic disease virus: genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs. *Virology* 2000; 276:349-63.

Mhatre MC, van Jaarsveld AS, Reiter RJ. Melatonin in the lacrimal gland: First demonstration and experimental manipulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 153:1186-92.

Miani M, Barthson J, Colli ML, Brozzi F, Cnop M, Eizirik DL. Endoplasmic reticulum stress sensitizes pancreatic beta cells to interleukin-1 β -induced apoptosis via Bim/A1 imbalance. *Cell Death Dis* 2013; 4:e701.

Mikami O, Park JH, Kimura T, Ochiai K, Itakura C. Hepatic lesions in young rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus. *Res Vet Sci* 1999; 66:237-42.

Miller S, Krijnse-Locker J. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6:363-74.

Miller WA, Koev G. Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology* 2000; 273:1-8.

Mitro S, Krauss H. Rabbit hemorrhagic disease: a review with special reference to its epizootiology. *Eur J Epidemiol* 1993; 9:70-8.

Mitzner SR. Extracorporeal liver support-albumin dialysis with the Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS). *Ann Hepatol Suppl* 2011; 1:21-8.

Miyasou T, Kwon AH, Tsuji K, Qiu Z, Okumura T, Kamiyama Y. Edaravone prevents Fasinduced fulminant hepatic failure in mice by regulating mitochondrial Bcl-xL and Bax. *Shock* 2008; 30:212-6.

Mizushima N. Autophagy: process and function. Genes Dev 2007; 21:2861-73.

Mizushima N, Klionsky, DJ. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr* 2007; 27:19-40.

Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010; 140:313-26.

Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; 27:107-32.

Molpeceres V, Mauriz JL, García-Mediavilla V, González P, Barrio JP, González-Gallego J. Melatonin is able to reduce the apoptotic liver changes induced by aging via inhibition of the intrinsic pathway of apoptosis. *J Gerontol Biol Sci* 2007; 62:687-95.

Montagnaro S, Ciarcia R, Pagnini F, De Martino L, Puzio MV, Granato GE, *et al.* Bovine herpesvirus type 4 infection modulates autophagy in a permissive cell line. *Cell Cycle* 2013; 12:6839-48.

Moore RY. A clock for the ages. Science 1999; 284:2102-3.

Moradpour D, Penin F, Rice C. Replication of hepatitis C virus. Nat Rev Micro 2007; 5:453-63.

Morisse JP, Le Gall G, Boilletot E. Hepatitis of viral origin in Leporidae: introduction and aetiological hypotheses. *Rev Sci Tech* 1991; 10:283-95.

Morita T, Togo S, Kubota T, Kamimukai N, Nishizuka I, Kobayashi T, *et al.* Mechanism of postoperative liver failure after excessive hepatectomy investigated using a cDNA microarray. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9:352-9.

Mosbah IB, Alfany-Fernández I, Martel C, Zaouali MA, Bintanel-Morcillo M, Rimola A, et al. Endoplasmic reticulum stress inhibition protects steatotic and non-steatotic livers in partial hepatectomy under ischemia-reperfusion. *Cell Death Dis* 2010; 1:e52.

Moumen A, Ieraci A, Patané S, Solé C, Comella JX, Dono R, *et al.* **Met signals hepatocyte survival by preventing fas-triggered FLIP degradation in a PI3k-akt dependent manner.** *Hepatology* **2007; 45:1210-7.**
Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-50.

Munafo DB, Colombo MI. A novel assay to study autophagy: Regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J Cell Sci* 2001; 114:3619-29.

Murphy N, Auzinger G, Bernel W, Wendon J. The effect of hypertonic sodium chloride on intracranial pressure in patients with acute liver failure. *Hepatology* 2004; 39:464-70.

Muto Y, Nouri-Aria KT, Meager A, Alexander GJ, Eddleston AL, Williams R. Enhanced tumour necrosis factor and interleukin-1 in fulminant hepatic failure. *Lancet* 1988; 2:72-4.

Mutze G, Cooke B, Alexander P. The initial impact of rabbit hemorrhagic disease on European rabbit populations in South Australia. *J Wildl Dis* 1998; 34:221-7.

Nakashima A, Tanaka N, Tamai K, Kyuuma M, Ishikawa Y, Sato H, *et al*. Survival of parvovirus B19-infected cells by cellular autophagy. *Virology* 2006; 349:254-63.

Nakazawa K, Ijima H, Fukuda J, Sakiyama R, Yamashita Y, Shimada M, *et al.* Development of a hybrid artificial liver using polyurethane foam/hepatocyte spheroid culture in a preclinical pig experiment. *Int J Artif Organs* 2002; 25:51-60.

Navasa M, García-Pagán JC, Bosch J, Riera JR, Banares R, Mas A, et al. Portal hypertension in acute liver failure. Gut 1992; 33:965-8.

Navascués CA, Rodríguez M, Sotorrio NG, Leiva P, Martínez A, Pérez R, *et al.* Epidemiological, clinical and biological characteristics of acute non-A, non-B hepatitis with and without hepatitis C virus infection. *Infection* 1994; 22:252-7.

Newsome PN, Plevris JN, Nelson LJ, Hayes PC. Animal models of fulminant hepatic failure: A critical evaluation. *Liver Transpl* 2000; 6:21-31.

Ng FW, Nguyen M, Kwan T, Branton PE, Nicholson DW, Cromlish JA, et al. p28 Bap31, a bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 1997; 139:327-38.

Niedźwiedzka-Rystwej P, Deptuła W. Apoptosis of peripheral blood leukocytes from rabbits infected with non-haemagglutinating strains of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *Vet Immunol Immunopathol* 2012; 149:54-7.

Nobili V, Carpino G, Alisi A, Franchitto A, Alpini G, De Vito R, *et al.* Hepatic progenitor cells activation, fibrosis, and adipokines production in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2012; 56:2142-53.

Nopparat C, Porter JE, Ebadi M, Govitrapong P. The mechanism for the neuroprotective effect of melatonin against methamphetamine-induced autophagy. *J Pineal Res* 2010; 49:383-9.

Norenberg MD, Jayakumar AR, Rama Rao KV, Panickar KS. New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab Brain Dis* 2007; 22:219-34.

Nussler A, Konig S, Ott M, Sokal E, Christ B, Thasler W, *et al.* Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases. *J Hepatol* 2006; 45:144-59.

O'Grady JG. Acute Liver Failure. Postgrad Med J 2005; 81:148-54.

O'Grady JG, Alexander GJ, Hayllar KM, Williams R. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 1989; 97:439-45.

O'Grady JG, Schalm SW, Williams R. Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet* 1993; 342:273-5.

O'Grady JG, Williams R. Classification of acute liver failure. Lancet 1993; 342:743.

Ochoa B, Syn WK, Delgado I, Karaca GF, Jung Y, Wang J, et al. Hedgehog signaling is critical for normal liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 2010; 51:1712-23.

Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, et al. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 2006; 26:9220-31.

Ogeturk M, Kus I, Pekmez H, Yekeler H, Sahin S, Sarsilmaz M. Inhibition of carbon tetrachloride-mediated apoptosis and oxidative stress by melatonin in experimental liver fibrosis. *Toxicol Ind Health* 2008; 24:201-8.

Ohlinger VF, Haas B, Meyers G, Weiland F, Thiel HJ. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J Virol* 1990; 64:3331-6.

Ohlinger VF, Haas B, Thiel HJ. Rabbit hemorrhagic disease (RHD): characterization of the causative calicivirus. *Vet Res* 1993; 24:103-16.

Okada T, Shiono Y, Kaneko Y, Miwa K, Hasatani K, Hayashi Y, et al. High prevalence of fulminant hepatic failure among patients with mutant alleles for truncation of ATP7B in Wilson's disease. *Scand J Gastroenterol*. 2010; 45:1232-7.

Orvedahl A, Alexander D, Tallóczy Z, Sun Q, Wei Y, Zhang W, et al. HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe* 2007; 1:23-35.

Ostapowicz GA, Fontana RJ, Schiødt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH, et al. U.S. Acute Liver Failure Study Group. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med* 2002; 137:947-54.

Pablos MI, Reiter RJ, Ortiz GG, Guerrero JM, Agapito MT, Chuang JI, *et al.* Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem Int* 1998; 32:69-75.

Pan G, O'Rourke K, Dixit VM. Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* 1998; 273:5841-5.

Pandi-Perumal SR, BaHammam AS, Brown GM, Spence DW, Bharti VK, Kaur C, et al. Melatonin antioxidative defense: therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes. *Neurotox Res* 2013; 23:267-300. **Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, et al.** p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilite degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 2007; 28:24131-45.

Panyasrivanit M, Khakpoor A, Wikan N, Smith DR. Co-localization of constituents of the dengue virus translation and replication machinery with amphisomes. *J Gen Virol* 2009; 90:448-56.

Papaevangelou G, Tassopoulos N, Roumeliotou-Karayannis A, Richardson C. Etiology of fulminant viral hepatitis in Greece. *Hepatology* 1984; 4:369-72.

Park JH, Lee YS, Itakura C. Pathogenesis of acute necrotic hepatitis in rabbit hemorrhagic disease. *Lab Anim Sci* 1995; 45:445-9.

Parra F, Prieto M. Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J Virol* 1990; 64:4013-5.

Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 1995; 21:1725-41.

Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, *et al.* Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 2005; 122:927-39.

Patton NM. Viral hemorrhagic disease. A major new disease problem of rabbits. *Rabbit Res* 1989; 12:64-7.

Pavanato A, Tuñón MJ, Sánchez-Campos S, Marroni CA, Llesuy S, González-Gallego J, *et al.* Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachlorideinduced cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2003; 48:824-9.

Pereira SP, Rowbotham D, Fitt S, Shearer MJ, Wendon J, Williams R. Pharmacokinetics and efficacy of oral versus intravenous mixed-micellar phylloquinone (vitamin K1) in severe acute liver disease. *J Hepatol* 2005; 42:365-70.

Pessayre D, Haouzi D, Fau D, Robin MA, Mansouri A, Berson A. Withdrawal of life support, altruistic suicide, fratricidal killing and euthanasia by lymphocytes: Different forms of drug-induced hepatic apoptosis. *J Hepatol* 1999; 31:760-70.

Pierrefiche G, Laborit H. Oxygen free radicals, melatonin, and aging. *Exp Gerontol* 1995; 30:213-27.

Plevris JN, Schina M y Hayes PC. Review article: the management of acute liver failure. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12:405-18.

Posthuma CC, Pedersen KW, Lu Z, Joosten RG, Roos N, Zevenhoven-Dobbe JC, et al. Formation of the arterivirus replication/transcription complex: a key role for nonstructural protein 3 in the remodeling of intracellular membranes. *J Virol* 2008; 82:4480-91.

Prentice E, Jerome WG, Yoshimori T, Mizushima N, Denison MR. Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy. *J Biol Chem* 2004; 279:10136-41.

Prieto JM, Fernández F, Álvarez V, Espi A, García-Marín JF, Álvarez M, et al. Immunohistochemical localisation of rabbit haemorrhagic disease virus VP-60 antigen in early infection of young and adult rabbits. *Res Vet Sci* 2000; 68:181-7.

Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 1999; 3:287-96.

Rademacher S, Oppert M, Jorres A. Artificial extracorporeal liver support therapy in patients with severe liver failure. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 5:591-9.

Rahman TM, Hodgson HJ. Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol* 2000; 81:145-57.

Rahman TM, Selden AC, Hodgson JF. A novel model of acetaminophen-induced acute hepatic failure in rabbits. *J Surg Res* 2002; 106:264-72.

Ramalingaswami V, Purcell RH. Waterborne non-A, non-B hepatitis. Lancet 1988; 1:571-3.

Redman J, Armstrong S, Ng KT. Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* 1983; 219:1089-91.

Reed JC. Bcl-2 family proteins. Oncogene 1998; 17:3225-36.

Reiter RJ. Melatonin and human reproduction. Ann Med 1998; 30:103-8.

Reiter RJ. Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: Antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol* 1995; 16:383-415.

Reiter RJ. The melatonin rhythm: Both a clock and a calendar. *Experientia* 1993; 49:654-64.

Reiter RJ. Melatonin: The chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 79:C153-8.

Reiter RJ. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev* 1980; 1:109-31.

Reiter RJ. Comparative physiology: Pineal gland. Annu Rev Physiol 1973; 35:305-28.

Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917:376-86.

Reiter RJ, Tan DX, Burkhardt S, Manchester LC. Melatonin in plants. Nutr Rev 2001; 59:286-90.

Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: Biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* 2003; 50:1129-46.

Reiter RJ, Tan DX, Tamura H, Cruz MH, Fuentes-Broto L. Clinical relevance of melatonin in ovarian and placental physiology: a review. *Gynecol Endocrinol* 2014; 30:83-9.

Ren F, Shu G, Liu G, Liu D, Zhou J, Yuan L, et al. Knockdown of p62/sequestosome 1 attenuates autophagy and inhibits colorectal cancer cell growth. *Mol Cell Biochem* 2013; 385:95-102.

Richard A, Tulasne D. Caspase cleavage of viral proteins, another way for viruses to make the best of apoptosis. *Cell Death Dis* 2012; 3:e277.

Richards AL, Jackson WT. How positive-strand RNA viruses benefit from autophagosome maturation. *J Virol* 2013; 87:9966-72.

Rifai K, Ernst T, Kretschmer U, Bahr MJ, Schneider A, Hafer C, et al. Prometheus--a new extracorporeal system for the treatment of liver failure. *J Hepatol* 2003; 39:984-90.

Rikker C. Liver support systems today. Orv Hetil 2009; 150: 2299-2307.

Ring-Larsen H, Palazzo U. Renal failure in fulminant hepatic failure and terminal cirrhosis: A comparison between incidence, types, and prognosis. *Gut* 1981; 22:585-91.

Rolando N, Harvey F, Brahm J, Philpott-Howard J, Alexander G, Gimson A, et al. Prospective study of bacterial infection in acute liver failure: an analysis of fifty patients. *Hepatology* 1990; 11:49-53.

Rolando N, Philpott-Howard J, Williams R. Bacterial and fungal infection in acute liver failure. *Semin Liver Dis* 1996; 16:389-402.

Rolando N, Wade J, Davalos M, Wendon J, Philpott-Howard J, Williams R. The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology* 2000; 32:734-9.

Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:519-29.

Rosell JM, Argüello JL, Badiola JI, Cuervo L. Enfermedad hemorrágica vírica. En: *Enfermedades del Conejo*. Ed. Mundi Prensa 2002; pp:331-43.

Rosser BG y Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 1995; 108:252-75.

Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 2006; 443:780-6.

Rubio S, Estévez F, Cabrera J, Reiter RJ, Loro J, Quintana J. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by melatonin in human myeloid H-60 cells. *J Pineal Res* 2007; 42:131-8.

Rumack BH, Bateman DN. Acetaminophen and acetylcysteine dose and duration: past, present and future. *Clin Toxicol (Phila)* 2012; 50:91-8.

Rutherford A, Chung RT. Acute liver failure: mechanisms of hepatocyte injury and regeneration. *Semin Liver Dis* 2008; 28:167-74.

Ryska M, Kieslichová E, Pantoflícek T, Ryska O, Zazula R, Skibová J, et al. Devascularization surgical model of acute liver failure in minipigs. *Eur Surg Res* 2004; 36:179-84.

Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:6230-4.

Saito C, Zwingmann C, Jaeschke H. Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. *Hepatology* 2010; 51:246-54.

Sakai H, Park SS, Kikkawa Y. Differential oxidase activity of hepatic and pulmonary microsomal cytochrome P-450 isozymes after treatment with cytochrome P-450 inducers. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187:1262-9.

Samson R, Trey C, Timme A, Saunders S. Fulminating hepatitis with recurrent hypoglycaemia and haemorrhage. *Gastroenterology* 1967; 53:291.

San-Miguel B, Álvarez M, Culebras JM, González-Gallego J, Tuñón MJ. N-acetyl-cysteine protects liver from apoptotic death in an animal model of fulminant hepatic failure. *Apoptosis* 2006; 11:1945-57.

Sánchez-Bueno F, García Pérez R, Torres Salmerón G, Fernández-Carrión J, Ramírez Romero P, Parrilla Paricio P. HELLP syndrome with severe liver dysfunction: a presentation of three cases. *Cir Esp* 2012; 90:33-7.

Sánchez-Campos S, Álvarez M, Culebras JM, González-Gallego J, Tuñón MJ. Pathogenic molecular mechanisms in an animal model of fulminant hepatic failure: Rabbit hemorrhagic viral disease. *J Lab Clin Med* 2004; 144:215-22.

Saner FH, Heuer M, Meyer M, Canbay A, Sotiropoulos GC, Radtke A, *et al.* When the heart kills the liver: acute liver failure in congestive heart failure. *Eur J Med Res* 2009; 14:541-6.

Santana S, Sastre I, Recuero M, Bullido MJ, Aldudo J. Oxidative stress enhances neurodegeneration markers induced by herpes simplex virus type 1 infection in human neuroblastoma cells. *PLoS One* 2013; 8:e75482.

Santana-Cabrera L, O'Shanahan-Navarro G, García-Martul M, Ramírez RA, Sánchez-Palacios M, Hernández-Medina E. Quality of artificial nutritional support in an intensive care unit. *Nutr Hosp 2006;* 21:661-6.

Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, *et al.* Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 2006; 22:159-68.

Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. A possible involvement of p62/sequestosome-1 in the process of biliary epithelial autophagy and senescence in primary biliary cirrhosis. *Liver Int* 2012; 45:4877-99.

Schiødt FV, Balko J, Schilsky M, Harrison ME, Thornton A, Lee WM. Thrombopoietin in acute liver failure. *Hepatology* 2003; 37:558-61.

Schröder M. Endoplasmic reticulum stress responses. Cell Mol Life Sci 2008; 65:862-94.

Schuchmann M, Galle PR. Apoptosis in liver disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 2001; 13:785-

90.

Schwerk C, Schulze-Osthoff K. Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 2005; 19:1-13.

Sen S, Rose C, Ytrebø LM, Davies NA, Nedredal GI, Drevland SS, *et al.* Effect of albumin dialysis on intracranial pressure increase in pigs with acute liver failure: A randomized study. *Crit Care Med* 2006; 34:158-64.

Shawcross DL, Davies NA, Mookerjee RP, Hayes PC, Williams R, Lee A, *et al.* Worsening of cerebral hyperemia by the administration of terlipressin in acute liver failure with severe encephalopathy. *Hepatology* 2004; 39:471-5.

Shawcross DL, Wendon JA. The neurological manifestations of acute liver failure. *Neurochem Int* 2012; 60:662-71.

Shelly S, Lukinova N, Bambina S, Berman A, Cherry S. Autophagy is an essential component of Drosophila immunity against vesicular stomatitis virus. *Immunity* 2009; 30:588-98.

Shien JH, Shieh HK, Lee LH. Experimental infections of rabbits with rabbit haemorrhagic disease virus monitored by polymerase chain reaction. *Res Vet Sci* 2000; 68:255-9.

Shinohara Y, Imajo K, Yoneda M, Tomeno W, Owaga Y, Kirikoshi H, *et al.* Unfolded protein response pathways regulate hepatitis C virus replication via modulation of autophagy. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 432:326-33.

Shrivastava S, Bhanja Chowdhury J, Steele R, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus upregulates Beclin1 for induction of autophagy and activates mTOR signaling. *J Virol* 2012; 86:8705-12.

Sinha S, Colbert CL, Becker N, Wei Y, Levine B. Molecular basis of the regulation of Beclin 1dependent autophagy by the gamma-herpesvirus 68 Bcl-2 homolog M11. *Autophagy* 2008; 4:989-97.

Sinha S, Levine B. The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene* 2008; 27:137-48.

Sir D, Chen WL, Choi J, Wakita T, Yen TS, Ou JH. Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology* 2008; 48:1054-61.

Snijder EJ, van der Meer Y, Zevenhoven-Dobbe J, Onderwater JJ, van der Meulen J, Koerten HK, *et al.* Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. *J Virol* 2006; 5927-40.

Song Z, Zhou Z, Chen T, Hill D, Kang J, Barve S, *et al.* S-adenosylmethionine (SAMe) protects against acute alcohol induced hepatotoxicity in mice small star, filled. *J Nutr Biochem* 2003; 14:591-7.

Stadlbauer V, Davies NA, Sen S, Jalan R. Artificial liver support systems in the management of complications of cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2008; 28:96-109.

Stange J, Mitzner SR, Risler T, Erley CM, Lauchart W, Goehl H, et al. Molecular adsorbent recycling system (MARS): clinical results of a new membrane-based blood purification system for bioartificial liver support. *Artif Organs* 1999; 23:319-30.

Sternberger LA, Hardy PH Jr, Cuculis JJ, Meyer HG. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 1970; 18:315-33.

Strauss G, Hansen BA, Kirkegaard P, Rasmussen A, Hjortrup A, Larsen FS. Liver function, cerebral blood flow autoregulation, and hepatic encephalopathy in fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1997; 25:837-9.

Stravitz RT, Kramer DJ. Management of acute liver failure. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 6:542-53.

Stravitz RT, Lisman T, Luketic VA, Sterling RK, Puri P, Fuchs M, et al. Minimal effects of acute liver injury/acute liver failure on hemostasis as assessed by thromboelastography. *J Hepatol* 2012; 56:129-36.

Strom S, Fisher R. Hepatocyte transplantation: new possibilities for therapy. *Gastroenterology* 2003; 124:568-71.

Sugawara K, Nakayama N, Mochida S. Acute liver failure in Japan: definition, classification, and prediction of the outcome. *J Gastroenterol* 2012; 47:849-61.

Sun Y, Li C, Shu Y, Ju X, Zou Z, Wang H, *et al.* Inhibition of autophagy ameliorates acute lung injury caused by avian influenza A H5N1 infection. *Sci Sign*al 2012; 45:ra16.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, *et al.* Molecular characterization of mitocondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397:441-6.

Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stressinduced apoptosis. *EMBO Rep* 2006; 7:880-5.

Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 2011; 13:184-90.

Tahan V, Atug O, Akin H, Eren F, Tahan G, Tarcin O, *et al.* Melatonin ameliorates methionineand choline-deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats. *J Pineal Res* 2009; 46:401-7.

Takahashi MN, Jackson W, Laird DT, Culp TD, Grose C, Haynes JI 2nd, *et al.* Varicella-Zoster virus infection induces autophagy in both cultured cells and human skin vesicles. *J Virol* 2009; 83:5466-76.

Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cualing HD, Sun M, Sato Y, *et al.* Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 2007; 9:1142-51.

Takayanagi S, Fukuda R, Takweuchi Y, Tsukada S, Yoshida K. Gene regulatory network of unfolde protein response genes in endoplasmic reticulum stress. *Cell Stress Chap* 2013; 18:11-23.

Tallóczy Z, Jiang W, Virgin HW 4th, Leib DA, Scheuner D, Kaufman RJ, *et al.* Regulation of starvation and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci* USA 2002; 99:190-5.

Tallóczy Z, Virgin HW 4th, Levine B. PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. *Autophagy* 2006; 2:24-9.

Tam EW, Haeusslein LA, Bonifacio SL, Glass HC, Rogers EE, Jeremy RJ, *et al.* Hypoglycemia is associated with increased risk for brain injury and adverse neurodevelopmental outcome in neonates at risk for encephalopathy. *J Pediatr* 2012; 161:88-93.

Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, *et al.* The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole *in vivo*. *Cancer Lett* 1993; 70:65-71.

Tang H, Da L, Mao Y, Li Y, Li D, Xu Z, et al. Hepatitis B virus X protein sensitizes cells to starvation-induced autophagy via upregulation of beclin 1 expression. *Hepatology* 2009; 49:60-71.

Taslidere E, Esrefoglu M, Elbe H, Cetin A, Ates B. Protective effects of melatonin and quercetin on experimental lung injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Exp Lung Res* 2014; 40:59-65.

Taylor MP, Burgon TB, Kirkegaard K, Jackson WT. Role of microtubules in extracellular release of poliovirus. *J Virol* 2009; 83:6599-609.

Taylor MP, Jackson WT. Viruses and arrested autophagosome development. *Autophagy* 2009; 5:870-1.

Taylor MP, Kirkegaard K. Modification of cellular autophagy protein LC3 by poliovirus. *J Virol* 2007; 81:12543-53.

Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003; 362:371-3.

Terblanche J, Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci* 1991; 36:770-4.

Theise ND, Dollé L, Kuwahara R. Low hepatocyte repopulation from stem cells: a matter of hepatobiliary linkage not massive production. *Gastroenterology*. 2013; 145:253-4.

Thompson J, Clark G. Rabbit calicivirus disease now established in New Zealand. *Surveillance* 1997; 24:5-6.

Tirasophon W, Welihinda AA, Kaufman RJ. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p)

in mammalian cells. Genes Dev 1998; 12:1812-24.

Tooze SA, Yoshimori T. The origin of the autophagosomal membrane. *Nature Cell Biol* 2010; 12:831-5.

Tovilovic G, Ristic B, Milenkovic M, Stanojevic M, Trakjovic V. The role and therapeutic potential of autophagy modulation in controlling virus-induced cell death. *Med Res Rev* 2014; 34:744-67.

Tovilovic G, Ristic B, Siljic M, Nikolic V, Kravic-Stevovic T, Dulovic M, et al. mTORindependent autophagy counteracts apoptosis in herpes simplex virus type 1-infected U251 glioma cells. *Microbes Infect* 2013; 15:615-24.

Trautwein C, Rakemann T, Malek NP, Plumpe J, Tiegs G, Manns MP. Concanavalin A induced liver injury triggers hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 1998; 101:1960-9.

Trey C, Davidson CS. The management of fulminant hepatic failure. *Prog Liver Dis* 1970; 3:282-98.

Tumbarello DA, Waxse BJ, Arden SD, Bright NA, Kendrick-Jones J, Buss F. Autophagyreceptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome. *Nat Cell Biol* 2012; 14:1024-35.

Túnez I, Muñoz MC, Medina FJ, Salcedo M, Feijóo M, Montilla P. Comparison of melatonin, vitamin E and L-carnitine in the treatment of neuro- and hepatotoxicity induced by thioacetamide. *Cell Biochem Funct* 2007; 25:119-27.

Tuñón MJ, Álvarez M, Culebras JM, González-Gallego J. Animal models of fulminant hepatic failure. *Nutr Hosp* 2007; 22:199-209.

Tuñón MJ, San-Miguel B, Crespo I, Jorquera F, Santamaría E, Álvarez M, et al. Melatonin attenuates apoptotic liver damage in fulminant hepatic failure induced by the rabbit hemorrhagic disease virus. *J Pineal Res* 2011a; 50:38-45.

Tuñón MJ, San-Miguel B, Crespo I, Riezu-Boj JI, Larrea E, Álvarez M, et al. Cardiotrophin-1 promotes a high survival rate in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin. *J Virol* 2011b; 85:13124-32.

Tuñón MJ, Sanchez-Campos S, García-Ferreras J, Álvarez M, Jorquera F, González-Gallego J. Rabbit hemorrhagic viral disease: Characterization of a new animal model of fulminant liver failure. *J Lab Clin Med* 2003; 141:272-8.

Tygstrup N, Ranek L. Fulminant hepatic failure. Clin Gastroenterol 1981; 10:191-208.

Ueda K, Park JH, Ochiai K, Itakura C. Disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbit haemorrhagic disease. *Jpn J Vet Res* 1992; 40:133-41.

Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, *et al.* Melatonin induces gammaglutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:838-47. Valla D, Flejou JF, Lebrec D, Bernuau J, Rueff B, Salzmann JL, *et al.* Portal hypertension and ascites in acute hepatitis: Clinical, hemodynamic and histological correlations. *Hepatology* 1989; 10:482-7.

van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: A Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* 2002; 9:1031-42.

Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. Physiol Rev 1998; 78:687-721.

Vollrath L. Mammalian pinealocytes: Ultrastructural aspects and innervation. *Ciba Found Symp* 1985; 117:9-22.

Waldhauser F, Ehrhart B, Forster E. Clinical aspects of the melatonin action: Impact of development, aging, and puberty, involvement of melatonin in psychiatric disease and importance of neuroimmunoendocrine interactions. *Experientia* 1993; 49:671-81.

Wallach D, Varfolomeev EE, Malini NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:331-67.

Wang DW, Tin YM, Yao YM. Advances in the management of acute liver failure. *World J Gastroenterol* 2013a; 19:7069-77.

Wang H, Xu DX, Lv JW, Ning H, Wei W. Melatonin attenuates lypopolysaccharide (LPS)induced liver damage in D-galactosamine-sensitized mice. *Toxicology* 2007; 237:49-57.

Wang J, Pan XL, Ding LJ, Liu DY, Da-Peng L, Jin T. Aberrant expression of beclin-1 and LC3 correlates with poor prognosis of human hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2013b; 8:e69038.

Wang W, Yan H, Dou C, Su Y. Human leptin triggers proliferation of A549 cells via blocking endoplasmic reticulum stress-related apoptosis. *Biochemistry (Mosc)* 2013c; 78:1333-41.

Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001; 15:2922-33.

Wang X, Dai Y, Ding Z, Khaidakov M, Mercanti F, Mehta JL. Regulation of autophagy and apoptosis in response to angiotensin II in HL-1 cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2013d; 440:696-700.

Wasley A, Grytdal S, Gallagher K. Surveillance for acute viral hepatitis. *MMWR Surveill Summ* 2008; 57:1-24.

Webber EM, Bruix J, Pierce RH, Fausto N. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology* 1998; 28:1226-34.

Wei G, Pattingre S, Sinha S, Bassik MC, Levine B. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell* 2008; 30:678-88.

Whitehouse T, Wendon J. Acute liver failure. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2013; 27:757-69.

Wilkinson SP, Arroyo V, Gazzard BG, Moodie H, Williams R. Relation of renal impairment and haemorrhagic diathesis to endotoxaemia in fulminant hepatic failure. *Lancet* 1974; 1:521-4.

Williams R. Classification, etiology, and considerations of outcome in acute liver failure. *Semin Liver Dis* 1996; 16:343-8.

Willis S, Day CL, Hinds MG, Huang DC. The bcl-2-regulated apoptotic pathway. *J Cell Sci* 2003; 116:4053-6.

Wirawan E, Lippens S, Vanden Berghe T, Romagnoli A, Fimia GM, Piacentini M, *et al.* Beclin: a role in membrane dynamics and beyond. *Autophagy* 2012; 8:6-17.

Wirblich C, Thiel HJ, Meyers G. Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from *in vitro* translation studies. *J Virol* 1996; 70:7974-83.

Wlodzimirow KA, Eslami S, Abu-Hanna A, Nieuwoudt M, Chamuleau RA. Acute liver failure: what is it? *Hepatology* 2012; 55:1306-7.

Wong J, Zhang J, Si X, Gao G, Mao I, McManus BM, *et al.* Autophagosome supports coxsackievirus B3 replication in host cells. *J Virol* 2008; 82:9143-53.

Wu YL, Lian LH, Jiang YZ, Nan JX. Hepatoprotective effects of salidroside fulminant hepatic failure induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide in mice. *J Pharm Pharmacol* 2009; 61:1375-82.

Wurtman RJ. Melatonin as a hormone in humans: a history. Yale J Biol Med 1985; 58:547-52.

Xi X, Zhang X, Wang B, Wang T, Wang J, Huang H, *et al.* The interplays between autophagy and apoptosis induced by enterovirus 71. *PLoS One* 2013; 8:e56966.

Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 2007; 9:1102-09.

Xie Z, Proud CG. Crosstalk between mTOR complexes. Nat Cell Biol 2013; 15:1263-5.

Xu WY. Viral haemorrhagic disease of rabbits in the People's Republic of China: epidemiology and virus characterisation. *Rev Sci Tech* 1991; 10:393-408.

Xu ZJ, Chen WX. Viral haemorrhagic disease in rabbits: a review. Vet Res Commun 1989; 13:205-12.

Yang DK, Kim BH, Lee KW, Kim JY, Kim HJ, Choi SS, *et al.* Identification and molecular characterization of a rabbit hemorrhagic disease virus variant (KV0801) isolated in Korea. *Korean J Vet Res* 2009; 49:207-13.

Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22:124-31.

Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009; 335:1-32.

Ylä-Anttila, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL. Monitoring autophagy by electron microscopy in Mammalian cells. *Methods Enzymol* 2009; 452:143-64.

Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, et al. Activation of caspase-12, an endoplastic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* 2001; 276:13935-40.

Yoo YM, Jeung EB. Melatonin suppresses cyclosporine A-induced autophagy in rat pituitary GH3 cells. *J Pineal Res* 2010; 48:204-11.

Yordy B, Iwasaki A. Autophagy in the control and pathogenesis of viral infection. *Curr Opin Virol* 2011; 1:196.

Yordy B, Tal MC, Hayashi K, Arojo O, Iwasaki A. Autophagy and selective deployment of Atg proteins in antiviral defense. *Int Immunol* 2013; 25:1-10.

Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemicki A, Schaffner T, Scapozza L, et al. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* 2006; 8:1124-32.

Ytrebø LM, Korvald C, Nedredal GI, Elvenes OP, Nielsen Grymyr OJ, Revhaug A. N-acetylcysteine increases cerebral perfusion pressure in pigs with fulminant hepatic failure. *Crit Care Med* 2001; 29:1989-95.

Ytrebø LM, Nedredal GI, Langbakk B, Revhaug A. An experimental large animal model for the assessment of bioartificial liver support systems in fulminant hepatic failure. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37:1077-88.

Zalckvar E, Berissi H, Mizrachy L, Idelchuk Y, Koren I, Eisenstein M, et al. DAP-kinase mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from $Bcl-X_L$ and induction of autophagy. *EMBO Rep* 2009; 10:285-92.

Zavodszky E, Vicinanza M, Rubinsztein DC. Biology and trafficking of ATG9 and ATG16L1, two proteins that regulate autophagosome formation. *FEBS Lett* 2013; 587:1988-96.

Zender L, Hutker S, Liedtke C, Tillmann HL, Zender S, Mundt B, et al. Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:7797-802.

Zhang K, Kaufman RF. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 2008; 454:455-62.

Zhang L, Wang A. Virus-induced ER stress and the unfolded protein response. *Front Plant Sci* 2012; 3:293.

Zhang T, Lin RT, Li Y, Douglas SD, Maxcey C, Ho C, *et al.* Hepatitis C virus inhbitis intracellular interferon alpha expression in human hepatic cell lines. *Hepatology* 2005a; 42:819-27.

Zhang X, Chen Y, Jenkins LW, Kochanek PM, Clark RS. Bench-to-bedside review: Apoptosis/programmed cell death triggered by traumatic brain injury. *Crit Care* 2005b; 9:66-

75.

Zhao Z, Ni D, Ghozalli I, Pirooz SD, Ma B, Liang C. UVRAG: at the crossroad of autophagy and genomic stability. *Autophagy* 2012; 8:1392-3.

Zhou H, Chen J, Lu X, Shen C, Zeng J, Chen L, et al. Melatonin protects against rotenoneinduced cell injury via inhibition of Omi and Bax-mediated autophagy in Hela cells. *J Pineal Res* 2012; 52:120-7.