

García Lastra, Rodrigo

Mecanismos moleculares implicados en la fisiopatología de la Enfermedad hemorrágica del conejo, un modelo animal de fallo hepático fulminante [Recurso electrónico] / Rodrigo García Lastra. – [León] : Universidad de León, Área de Publicaciones, 2010

1 disco compacto (CD-ROM) : gráf. , fot ; 12 cm

Tesis-Universidad de León, 2009. – Índices. -- Bibliogr. – Datos. -- Fecha de defensa, 03-07-2009

ISBN 978-84-9773-506-3

1. Universidad de León-Tesis y disertaciones académicas-2009. 2. Hígado-Enfermedades. 3. Conejos-Enfermedades. I. Título. II. Universidad de León. Área de Publicaciones

616.36(043.2)

636.92.09(043.2)

Tesis defendida con fecha 30-07-2009

TRIBUNAL:

González Gallego, Javier (presidente)
Carvajal Urueña, Ana María (secretario)
García Monzon, Carmelo (vocal)
Prieto Martín, José Miguel (vocal)
Culebras Fernández, Jesús (vocal)

© Universidad de León

I.S.B.N. 978-84-9773-506-3

Depósito Legal: LE-762-2010

TESIS
DOCTORAL



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Dpto. Sanidad Animal
Dpto. Ciencias Biomédicas



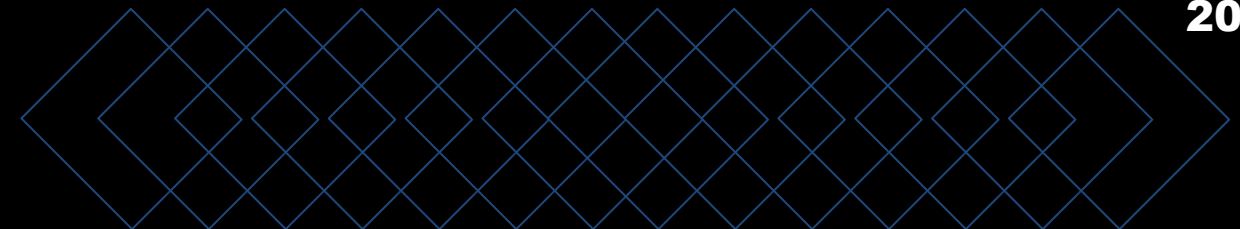
MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD
HEMORRÁGICA DEL CONEJO, UN MODELO ANIMAL DE FALLO HEPÁTICO FULMINANTE

Tesis Doctoral

**Mecanismos moleculares implicados en la
fisiopatología de la Enfermedad hemorrágica
del conejo, un modelo animal de
fallo hepático fulminante**

RODRIGO GARCÍA LASTRA
2009

**Rodrigo García Lastra
2009**





UNIVERSIDAD DE LEÓN

Departamento de Sanidad Animal

Departamento de Ciencias Biomédicas

Mecanismos moleculares implicados en la fisiopatología de la Enfermedad hemorrágica del conejo, un modelo animal de fallo hepático fulminante



**Memoria presentada por el Licenciado Rodrigo García Lastra para la
obtención del grado de Doctor por la Universidad de León**

León, 2009



UNIVERSIDAD DE LEÓN

**INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)**

Los Dres. Dña. M^a Jesús Tuñón González y D. Marcelino Álvarez Martínez, como directores de la Tesis Doctoral titulada: “Mecanismos moleculares implicados en la fisiopatología de la Enfermedad hemorrágica del conejo, un modelo animal de fallo hepático fulminante” realizada por D. Rodrigo García Lastra, en el Departamento de Sanidad Animal, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a ___ de _____ de 2009.

Los directores de la Tesis Doctoral,

Fdo: Dra. M^a Jesús Tuñón González

Fdo: Dr. Marcelino Álvarez Martínez



UNIVERSIDAD DE LEÓN

**ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y
Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)**

El Departamento de Sanidad Animal en su reunión celebrada el día ____ de _____ de 2009 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada: “Mecanismos moleculares implicados en la fisiopatología de la Enfermedad hemorrágica del conejo, un modelo animal de fallo hepático fulminante”, dirigida por los Dres. Dña. M^a Jesús Tuñón González y D. Marcelino Álvarez Martínez, elaborada por D. Rodrigo García Lastra y cuyo título en inglés es el siguiente: “Molecular mechanisms implicated in the physiopathology of the Rabbit hemorrhagic disease, an animal model of fulminant hepatic failure”.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a ____ de _____ de 2009.

VºBº

El Director del Departamento,

El secretario,

Fdo.: Dr. Elías F. Rodríguez Ferri

Fdo.: Dr. Juan Fregeneda Grandes

AGRADECIMIENTOS:

A los directores de esta Tesis, la Dra. M^a Jesús Tuñón González y el Dr. Marcelino Álvarez Martínez, por la dedicación, confianza, apoyo y amistad depositados en mí durante este tiempo.

Al Dr. Javier González Gallego, Director del Instituto de Biomedicina de la Universidad de León, por la confianza depositada en este proyecto y por la inestimable ayuda a la hora de desarrollarlo.

A los miembros del Departamento de Sanidad Animal. De manera especial a mis compañeros Sonia, Karina, Jesús Collazos, Jesús Osorio, Agustín, Álvaro, Héctor, Fausto, Maite, Catalina, Idoia, María, Pili, Héctor, Angélica y Coral. A los profesores Juan Fregeneda, Ana Carvajal, Miguel Aller, Pedro Rubio, Nati Díez Baños, y Charo Argüello. A Gloria y Teles. A todos ellos por compartir conmigo más de 4 años y convertirse durante este tiempo en mi segunda familia.

A Irene, Bea, Elena, Victoria y Javi, por su compañía, consejos y cotilleos en los laboratorios y despacho del Instituto de Biomedicina. En especial a Irene y Bea que me han ayudado de forma impagable en el trabajo diario.

Al resto de miembros del Departamento de Ciencias Biomédicas, porque todos han contribuido en cierta medida, con sus consejos y apoyo, a la finalización de esta tesis.

A Francisco Álvarez Baldor, Rubén Iglesias y el resto de miembros de AFRIVEPA por enseñarme todo lo que sabían e inculcarme la devoción que siento por la profesión veterinaria.

Por último, quiero agradecer a mis padres todo el apoyo y cariño que me han prestado en todo momento y por la educación personal e intelectual que me han brindado. A mi hermana y mi tía, por el tiempo que no he pasado con ellas. Y sobre todo, a Coral, la persona que me anima cada día a ser mejor. Sin su amor y estabilidad nunca lo hubiese conseguido.

Esta tesis también es vuestra.

“Los científicos no estudian la naturaleza porque sea útil; la estudian porque les place, y les place porque es bella. Si la naturaleza no fuese bella, no valdría la pena conocerla, no valdría la pena vivir la vida”

(Henri Poincaré, Matemático y filósofo)

Parte de los resultados expuestos en la presente memoria han sido objeto de las siguientes publicaciones y comunicaciones:

“Implicación de las vías de señalización MAPK y los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B en un modelo animal de fallo hepático fulminante”. R. García-Lastra, B. San-Miguel, F. Jorquera, M. Álvarez, J. González-Gallego y M.J. Tuñón. XXXIII Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). Madrid, 20-22 de febrero de 2008.

Gastroenterol Hepatol. 2008; 31(Supl 1): 125.

“MAP Kinase-dependent pathways are activated during programmed cell death in a viral model of fulminant hepatic failure”. R. García-Lastra, M. Álvarez, B. San-Miguel, F. Jorquera, J. González-Gallego y M.J. Tuñón. 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Milan, Italia. 23-27 de abril de 2008.

J Hepatol. 2008; 48 (Supl 2): S73.

“Influence of mitogen-activated kinases and transcription factors activation during apoptosis induction in a viral model of fulminant hepatic failure”. Rodrigo García-Lastra, Marcelino Álvarez, Beatriz San-Miguel, José Luis Mauriz, Jesús Manuel Culebras, Javier González-Gallego y María Jesús Tuñón. 21st Annual Congress of the Surgical Infection Society of Europe. Antalya, Turquía. 1-3 de Mayo de 2008.

Surgical Infections. 2008; 9 (2): 300.

“La cardiotrofina-1 (CT-1) aumenta la supervivencia en un modelo de fallo hepático fulminante (FHF) por hepatitis vírica en el conejo”. M.J. Tuñón, R. García-Lastra, I. Crespo, B. San-Miguel, M. Iñiguez, E. Larrea, I. González, M. Álvarez, I. Herrero, J. Quiroga, J.

González-Gallego, J. Prieto. XXXIV Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). Madrid, 25-27 de febrero de 2009.
Gastroenterol Hepatol. 2009; 32: 129-73.

“Cardiotrophin-1 (CT-1) improves survival in a rabbit model of fulminant hepatic failure (FHF) of viral origin”. M.J. Tuñón, R. García-Lastra, I. Crespo, B. San-Miguel, M. Íñiguez, E. Larrea, I. González, I. Herrero, J. Quiroga, M. Álvarez, J. González-Gallego, J. Prieto. 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Copenhagen, Dinamarca. 22-26 de Abril de 2009.

“Effect of N-acetil-cysteine in the modulation of MAPK pathways and apoptosis in a viral model of fulminant hepatic failure”. R. García-Lastra, M. Álvarez, B. San-Miguel, I. Crespo, J.M. Culebras, J. González-Gallego, M.J. Tuñón. 22nd Annual Congress of the Surgical Infection Society of Europe. Chicago, Illinois, EEUU. 6-9 de Mayo de 2009.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIF	Factor inductor de apoptosis
ALAT	Alanino aminotransferasa
AP-1	Proteína activadora 1
Apaf-1	Factor activador de apoptosis 1
ARN	Ácido ribonucleico
ASAT	Aspartato aminotransferasa
ASK1	Proteína quinasa reguladora de la señal de apoptosis 1
BR	Bilirrubina
CID	Coagulación intravascular diseminada
CIS	Proteína inducible por citocinas
Cit-c	Citocromo c
cNOS	Enzima óxido nítrico sintasa constitutiva
COX-2	Ciclooxigenasa (inducible) 2
EBHS	Síndrome de la fiebre parda europea
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EH	Encefalopatía hepática
eNOS	Enzima óxido nítrico sintasa endotelial (NOS3)
EPO	Eritropoyetina
ERK	Proteína quinasa regulada por señales extracelulares
EROS	Especies reactivas de oxígeno

FADD	Proteína dominio de muerte asociada a Fas
Fas-L	Fas ligando
FHF	Fallo hepático fulminante
GABA	Ácido gamma amino butírico
G-CSF	Factor estimulante de las colonias de granulocitos
H/E	Hematoxilina/eosina
HCC	Carcinoma hepatocelular
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
hpi	Horas postinfección
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IFN	Interferón
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo I
IL	Interleucina
iNOS	Enzima óxido nítrico sintasa inducible (NOS2)
JAK	Proteína quinasa janus
JNK	Proteína quinasa amino-terminal c-Jun
LCR	Líquido céfalloarraquídeo
LIF	Factor inhibidor de leucemia
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MHV-3	Virus de la hepatitis del ratón tipo 3
MK	Proteína quinasa activada por MAPKs
NF-κB	Factor de transcripción nuclear kappa B

NGF	Factor de crecimiento nervioso
NK	Linfocito natural killer
nNOS	Enzima óxido nítrico sintasa neuronal (NOS1)
NO	Óxido nítrico
pb	Pares de bases
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDK	Serina-treonina quinasa dependiente de fosfolípidos
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PIAS	Proteína inhibidora de la activación de las STATs
PIC	Presión intracraneal
PKB	Proteína quinasa B
POD	Piruvato oxidasa
RHD	Enfermedad hemorrágica del conejo
RHDV	Virus de la Enfermedad hemorrágica del conejo
SAA	Amiloide sérico A
SARS	Síndrome respiratorio agudo severo
siRNA	ARN pequeño de interferencia
SNC	Sistema nervioso central
SOCS	Proteínas supresoras de la señal de citocinas
STAT	Proteína transdutora de señales y activadora de la transcripción
TH	Transplante hepático
THO	Transplante hepático ortópico
TNF	Factor de necrosis tumoral

TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
TP	Tiempo de protrombina
UV	Ultravioleta
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular 1
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
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	9
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1.- El fallo hepático fulminante	9
2.1.1.- Etiología.....	10
2.1.1.1.- <i>Infeciosa</i>	11
2.1.1.2.- <i>Tóxica</i>	12
2.1.1.3.- <i>Otras</i>	13
2.1.2.- Clínica.....	13
2.1.2.1.- <i>Alteraciones del sistema nervioso central</i>	14
2.1.2.2.- <i>Alteraciones renales y del equilibrio ácido-base</i>	18
2.1.2.3.- <i>Alteraciones respiratorias</i>	21
2.1.2.4.- <i>Alteraciones de la coagulación</i>	22
2.1.2.5.- <i>Alteraciones metabólicas</i>	23
2.1.3.- Anatomía patológica.....	23
2.1.4.- Fisiopatología	24
2.1.5.- Mecanismos moleculares.....	26
2.1.5.1.- <i>Citocinas inflamatorias y Fas-L</i>	27
2.1.5.2.- <i>Moléculas de adhesión</i>	31
2.1.5.3.- <i>Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK)</i> ...31	
2.1.5.4.- <i>Vía de señalización PI3K/Akt</i>	35
2.1.5.5.- <i>Factores de transcripción NF-κB y AP-1</i>	37
2.1.5.6.- <i>Enzimas iNOS y COX-2</i>	40
2.1.5.7.- <i>Vía de señalización JAK-STAT</i>	42
2.1.5.8.- <i>Regulación de la vía JAK/STAT por las proteínas supresoras de la señal de citocinas (SOCS)</i>	45
2.1.5.9.- <i>Importancia de la apoptosis</i>	46
2.1.6.- Diagnóstico	52
2.1.7.- Clasificación	53
2.1.8.- Tratamiento.....	55
2.2.- Modelos animales de fallo hepático fulminante.....	61
2.2.1.- Modelos quirúrgicos	63
2.2.1.1.- <i>Hepatectomía total y parcial</i>	63

2.2.1.2.- <i>Desvascularización</i>	64
2.2.2.- Modelos inducidos por sustancias químicas.....	65
2.2.3.- Modelos víricos	67
2.3.- La Enfermedad hemorrágica del conejo como modelo de fallo hepático fulminante.....	68
2.3.1.- Etiología.....	69
2.3.2.- Patogenia	70
2.3.3.- Cuadro Clínico.....	72
2.3.4.- Lesiones	74
2.3.4.1.- <i>Macroscópicas</i>	74
2.3.4.2.- <i>Microscópicas</i>	75
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	77
3.1. Aparatos	79
3.2.- Soluciones.....	80
3.3.- Animales	81
3.4.- Diseño experimental	81
3.4.1.- Obtención del inóculo vírico	81
3.4.2.- Titulación del virus.....	82
3.4.3.- Inoculación de los animales.....	83
3.4.4.- Recogida de muestras	83
3.5.- Métodos analíticos	84
3.5.1.- Determinaciones en plasma.....	84
3.5.1.1.- <i>Actividad aspartato aminotransferasa (AST)</i>	84
3.5.1.2.- <i>Actividad alanino aminotransferasa (ALT)</i>	85
3.5.1.3.- <i>Concentración de bilirrubina total</i>	86
3.5.2.- Determinaciones en sangre.....	86
3.5.2.1.- <i>Concentración de glucosa</i>	86
3.5.3.- Determinaciones en hígado	86
3.5.3.1.- <i>Obtención de homogeneizado total</i>	86
3.5.3.2.- <i>Obtención de la fracción citosólica</i>	87
3.5.3.3.- <i>Obtención de la fracción nuclear</i>	87
3.5.3.4.- <i>Concentración de proteína</i>	88
3.5.3.5.- <i>Western blot</i>	89
3.5.3.6.- <i>Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)</i>	93
3.5.4.- Tratamiento estadístico.....	94
4.- RESULTADOS	95
4.1.- Efecto del virus de la RHD sobre diversos parámetros plasmáticos indicadores de daño hepático	97
4.2.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de las citocinas TNF- α e IL-6 y de Fas-L	99

4.3.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de las MAPKs	102
4.4.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de Akt.	105
4.5.- Efecto del virus de la RHD sobre la activación hepática de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B	107
4.6.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de las proteínas proinflamatorias COX-2 y VCAM-1	111
4.7.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de los factores de activación STAT.....	113
4.8.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de las proteínas SOCS.....	115
5.- DISCUSIÓN.....	117
5.1.- Efecto del virus de la RHD sobre diversos parámetros plasmáticos indicadores de daño hepático.....	119
5.2.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de las citocinas TNF- α e IL-6 y de Fas-L	121
5.3.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de las MAPKs	124
5.4.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de Akt.	127
5.5.- Efecto del virus de la RHD sobre la activación hepática de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B	130
5.6.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de las proteínas proinflamatorias VCAM-1 y COX-2	132
5.7.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de los factores de activación STAT.....	134
5.8.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de las proteínas SOCS.....	138
6.- CONCLUSIONES.....	141
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	147

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.-	<i>Etiología del FHF en España entre los años 1992 y 2004</i>	11
Figura 2.-	<i>Cascada de las MAPKs</i>	34
Figura 3.-	<i>Activación y funciones de la ruta PI3K/Akt</i>	36
Figura 4.-	<i>Mecanismo de acción del factor de transcripción NF-κB</i>	39
Figura 5.-	<i>Vía de señalización JAK/STAT y su regulación por las proteínas SOCS</i>	44
Figura 6.-	<i>Diferencias entre la muerte celular por apoptosis y por necrosis</i>	48
Figura 7.-	<i>Vías de la apoptosis</i>	52
Figura 8.-	<i>Genoma del virus de la RHD</i>	70
Figura 9.-	<i>Titulación del virus de la RHD por la técnica de hemoaglutinación</i>	82
Figura 10.-	<i>Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática del TNF-α y la IL-6</i>	100
Figura 11.-	<i>Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática del Fas-L</i>	101
Figura 12.-	<i>Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de la MAPK ERK</i>	103
Figura 13.-	<i>Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de la MAPK ERK</i>	104
Figura 14.-	<i>Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de Akt</i>	106

Figura 15.-	<i>Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de la subunidad p50</i>	107
Figura 16.-	<i>Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de la subunidad p65</i>	108
Figura 17.-	<i>Efecto del virus de la RHD sobre la activación hepática del factor NF-κB</i>	109
Figura 18.-	<i>Efecto del virus de la RHD sobre la activación hepática del factor AP-1</i>	110
Figura 19.-	<i>Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de las proteínas proinflamatorias VCAM-1 y COX-2</i>	112
Figura 20.-	<i>Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de los factores de activación STAT</i>	113
Figura 21.-	<i>Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de la proteína SOCS3</i>	115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- <i>Efecto del virus de la RHD sobre diversos parámetros bioquímicos plasmáticos.....</i>	98
--	----

1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El fallo hepático fulminante (FHF) es un síndrome clínico muy grave asociado a una alta morbilidad y mortalidad (Riordan y Williams, 2000), a pesar de los grandes avances que se han producido en los campos tanto de manejo de los cuidados intensivos como en el trasplante hepático (Plevris y cols., 1998; Nussler y cols., 2006).

El estudio de los mecanismos moleculares de regeneración hepática y la patogénesis del fallo multiorgánico en el FHF son investigaciones que gozan actualmente de un enorme interés. Se sabe poco acerca de la competencia de los componentes individuales del proceso regenerativo hepático en el FHF, pero es obvio que hay un variable, pero marcado, grado de pérdida y daño celular en el hígado, junto con una ausencia de actividad regeneradora (Riordan y Williams, 2000; Newsome y cols., 2000) y una sobreproducción de citocinas tales como TNF- α , IL-1 e IL-6 (Muto y cols., 1988; Iwai y cols, 1998). Asimismo, se ha indicado que el mecanismo de la apoptosis puede estar implicado en gran medida en los casos de FHF (Sakaida y cols., 2005; Schattenberg y cols., 2006). Tanto el conocimiento como el tratamiento de este síndrome han estado limitados por la falta de modelos animales satisfactorios que cumplan los criterios que definen a un modelo animal adecuado de FHF (Terblanche y Hickman, 1991).

El virus de la Enfermedad hemorrágica del conejo (RHD, de sus siglas en inglés) es un miembro de la familia Caliciviridae que causa en los conejos domésticos y silvestres una enfermedad aguda de alta mortalidad que fue descrita por vez primera en China hace dos décadas (Liu y cols., 1984). La enfermedad se caracteriza por una hepatitis grave que evoluciona rápidamente a la muerte dentro de las 48 a las 72 horas después de la infección en un 90% de los casos. El daño hepático juega un

papel patogénico fundamental y, de hecho, desde el punto de vista histológico es muy similar a la hepatitis vírica mortal que causa el FHF en el hombre (Mikami, 1999). Nuestro grupo ha indicado recientemente que, por las características clínicas y los cambios en la bioquímica sanguínea, en la monitorización de la presión intracraneal así como en otros aspectos relacionados con el estrés oxidativo, la RHD es un modelo adecuado de FHF (Tuñón y cols., 2003; Sánchez-Campos y cols., 2004). También se ha sugerido que la apoptosis puede ser determinante en el desarrollo de la patogenia de la RHD (Alonso y cols., 1998; Ramiro-Ibáñez y cols., 1999; Jung y cols., 2000; San Miguel y cols., 2006).

Es de esperar, por tanto, que en la RHD se produzca una activación de los macrófagos con liberación de citocinas tales como el TNF- α que inducen el desarrollo de estrés oxidativo y la liberación de óxido nítrico (NO). Estos factores pueden alterar la expresión génica a través de la activación de factores de transcripción (por ejemplo el NF- κ B), llevando a la sobrerregulación de citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, Fas ligando, etc, (Kaplovitz, 2000; Ali y Mann, 2004) aspectos todos ellos involucrados en mayor o menor medida en el desarrollo del FHF (Goto y cols., 2006).

Por todo ello, con el presente trabajo nos planteamos profundizar en los principales mecanismos implicados en la fisiopatología de la RHD. De esta forma podremos inferir el papel que juegan en el FHF el estrés oxidativo, la activación de diversos factores de transcripción, agentes pro-inflamatorios, y diversas cascadas de proteínas quinasas, entre otros.

Ante estos datos, los objetivos planteados son:

Realizar el seguimiento temporal de la activación de diversos factores de transcripción, la expresión de citocinas, genes pro-inflamatorios y las principales vías de señalización de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), y su interrelación en el modelo animal de FHF de etiología vírica.

De esta forma, y una vez esclarecidas las principales vías y/o mediadores involucrados en la muerte por el FHF, puedan establecerse los abordajes terapéuticos más apropiado.

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.- El fallo hepático fulminante

El término *fallo hepático fulminante* (FHF) fue definido hace más de 30 años por Trey y Davidson para describir un cuadro clínico agudo, de pocas semanas de evolución y sin evidencias de enfermedad hepática preexistente (Trey y Davidson, 1970). Desde entonces se han introducido diversas modificaciones en la definición y, hasta el momento, no hay una nomenclatura universalmente aceptada.

El FHF es un síndrome clínico muy grave asociado con una alta morbilidad y 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 (Plevris y cols., 1998; Nussler y cols., 2006; Santana-Cabrera y cols., 2006). El FHF se caracteriza por un rápido deterioro de la función hepática con desarrollo de encefalopatía hepática (EH) en pacientes sin historia previa de enfermedad hepática o con alteraciones hepáticas crónicas (O'Grady y cols., 1993). La etiología del FHF es muy diversa y con variaciones geográficas, e incluye hepatitis víricas, hepatotoxinas, lesiones cardiovasculares, hepatitis autoinmunes, alteraciones metabólicas y anatómicas del hígado; ahora bien, en una gran proporción de pacientes se desconoce su etiología (Riordan y Williams, 2000).

El FHF es un síndrome que se produce como consecuencia del fallo funcional de una gran parte del parénquima hepático (Rosser y Gores, 1995). El diagnóstico del cuadro se basa, por un lado, en la ausencia de enfermedad hepática previa, y por otro, en la presencia de signos clínicos y analíticos que evidencian la hipofunción celular hepática,

siendo un buen índice el alargamiento del tiempo de protrombina que no se corrige con vitamina K.

2.1.1.- Etiología

Las causas que originan el FHF son diversas y existe una considerable variación geográfica. Aunque los virus y los fármacos son los responsables de la mayoría de los casos, en un alto porcentaje de los pacientes la etiología es indeterminada (O'Grady, 2005), sobre todo en casos pediátricos (Lee y cols., 2008). En los países orientales y en el mundo desarrollado el FHF es originado principalmente por infecciones víricas, especialmente la hepatitis B pero también la A y la E (Acharya y cols., 2000). Por el contrario, en los países anglosajones más del 65% de los casos de FHF son debidos a drogas y fármacos siendo la intoxicación por paracetamol la principal causa de FHF en el Reino Unido y en los EEUU (Bernal, 2003). En España el principal responsable es el virus de la hepatitis B mientras que la intoxicación por paracetamol solo es responsable de un puñado de casos y en uno de cada tres casos el FHF es provocado por una causa indeterminada (Escorsell y cols., 2007) (Fig. 1).

Las causas que originan el FHF las podemos dividir en tres grandes grupos:

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

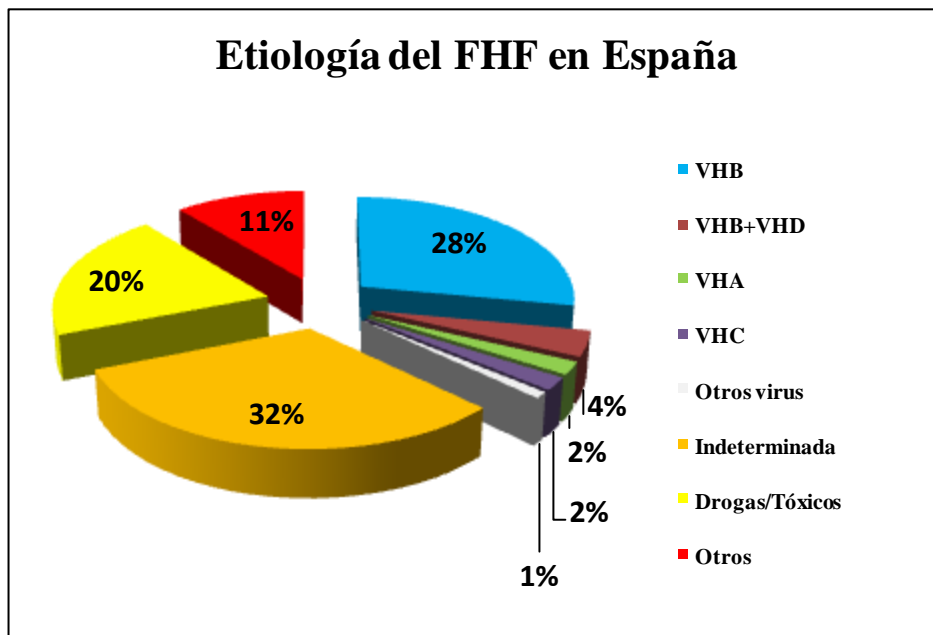


Figura 1.- Etiología del FHF en España entre los años 1992 y 2004 (Escorsell y cols. 2007).

2.1.1.1.- Infecciosa

La hepatitis vírica aguda constituye una de las causas más frecuentes de FHF, aunque con una variabilidad geográfica en su prevalencia que puede ir desde el 72% en París al 33% en Londres (Bernuau y col., 1986; O'Grady y cols., 1989) y siendo de un 40% en España (Escorsell y cols., 2007). Los principales virus implicados en la aparición del síndrome de FHF son, fundamentalmente, los de las hepatitis víricas tipos A (VHA), B (VHB), D (VHD) y E (VHE). En el caso del VHA el riesgo de que desencadene hepatitis fulminante o subfulminante es bajo (0,01%) y del conjunto de las hepatitis víricas que pueden evolucionar como una hepatitis fulminante es la que tiene el mejor

pronóstico. El VHB es la causa principal de FHF a escala mundial, llegando a ser responsable del 70% de los casos de origen vírico (Papaevangelou y cols., 1984). 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 cols., 2008).

Otros virus implicados en casos de FHF son los del herpes simple tipos 1 y 2, varicela-zoster, citomegalovirus, Epstein-Barr, adenovirus, paramixovirus y de forma aislada se han comunicado casos de hepatitis fulminantes atribuibles a parvovirus B19, cosackie B y arbovirus, estando su capacidad de dar lugar a FHF condicionada, sobre todo, por coexistir estados de inmunodepresión en los pacientes (Bernuau y cols., 1986; Liang y cols., 1993., Langnas y cols., 1995; Feranchak y cols., 1998).

2.1.1.2.- Tóxica

En general, se considera que la hepatitis debida a intoxicaciones provoca únicamente el 1-2% de los casos de FHF (Bernuau y cols., 1986). Sin embargo, en los países anglosajones, el paracetamol es la causa del 50 al 60% de los casos de insuficiencia hepática fulminante (O'Grady y cols., 1989; Lee y Seremba, 2008), predominando en este caso la intención suicida sobre el envenenamiento accidental. La tasa de hospitalización debido a una sobredosis accidental o intencionada de paracetamol se estima en más de 26.000 casos al año en USA (Nourjah y cols., 2006).

Otros agentes causantes de FHF son los anestésicos halogenados, sobre todo el halotano, los antiinflamatorios no esteroideos, los agentes

anti-Bacilo de Koch isoniazida y pirazinamida, los inhibidores de la monoamino oxidasa, sobre todo si se asocian con inductores enzimáticos (Boelsterli y cols., 1995) y algunos antiepilépticos (Björnsson, 2008).

Las setas del género *Amanita* y disolventes industriales como el tetracloruro de carbono e hidrocarburos volátiles se encuentran entre los agentes capaces de causar FHF (Karakayali y cols., 2007).

2.1.1.3.- Otras

Aunque con una baja frecuencia también son causas de FHF las asociadas al embarazo (ruptura hepática espontánea), enfermedad veno-oclusiva, síndrome de Budd-Chiari, enfermedad de Wilson, hemocromatosis, metástasis tumorales, sepsis, isquemia y el fracaso de trasplante hepático (Grabhorn y cols., 2006; Wong y Wai, 2006; Eisenbach y cols., 2007).

2.1.2.- Clínica

Tanto las manifestaciones clínicas como los análisis de laboratorio son comunes en las diferentes etiologías, salvo peculiaridades específicas. La encefalopatía hepática (EH) constituye un criterio diagnóstico. Casi siempre la hiperbilirrubinemia es de tipo conjugado y la ictericia es un signo precoz y rápidamente progresivo. Hay un descenso progresivo del tamaño hepático con disminución de la matidez a la percusión.

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 (erosiones agudas de la mucosa gástrica). La insuficiencia renal aparece en el 30-75% de los casos y se asocia a un peor pronóstico. Es habitual la circulación hiperdinámica, caracterizada por taquicardia, hipotensión, aumento del gasto cardíaco y disminución de las resistencias periféricas, relacionado todo ello con un desequilibrio entre factores vasodilatadores y factores vasoconstrictores a favor de los primeros.

Es común la hipocapnia secundaria a la hiperventilación central que se produce en la EH y la hipopotasemia secundaria a pérdidas e hiperaldosteronismo secundario. La hiponatremia es generalmente dilucional. Pueden aparecer hipomagnesemia e hipocalcemia. Los pacientes con FHF desarrollan infecciones frecuentes de origen entérico. Son frecuentes también las infecciones por Gram positivos y hongos, favorecidas por el manejo diagnóstico y terapéutico de estos enfermos. En su patogenia se implican alteraciones funcionales de los neutrófilos, disminución del complemento sérico y quizás una deficiencia de la función de las células de Kupffer.

Analizaremos por sistemas las características clínicas y la patogenia de su afectación en el curso del FHF.

2.1.2.1.- Alteraciones del sistema nervioso central

La patogenia de la EH no es todavía muy conocida; no obstante, los dos factores implicados con mayor frecuencia han sido el incremento

de la concentración de amonio en el sistema nervioso central (SNC) y el aumento del ácido gamma amino butírico (GABA) como neurotransmisor inhibitorio (Lee, 1993; Mas y Rodes, 1997).

La neurotoxicidad del amonio es bien conocida. Su concentración en la sangre y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) aumenta en el FHF. El amonio inhibe los canales de cloro, lo que contribuye a la depresión del SNC, disminuye la neurotransmisión glutamatérgica, causando neurodepresión y además altera la barrera hematoencefálica. No obstante, existen varias observaciones que no apoyan que el amonio sea el único factor en el desarrollo de la encefalopatía (Jalan y Hayes, 1997). Así se ha propuesto un papel para otras neurotoxinas derivadas del intestino tales como mercaptanos, fenoles o ácidos grasos de cadena corta.

El estado normal de alerta está determinado por un fino equilibrio entre los neurotransmisores excitadores e inhibitorios. 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 GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio 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. El mecanismo por el cual dicho tono aumenta es desconocido: la disminución de los receptores GABA presinápticos y el aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica estarían favoreciendo el aumento de la activación de los receptores GABA, junto con la síntesis de neuroesteroides por la astrogliosis (Basile y Jones, 1997).

Por último, se ha sugerido que el amonio por sí solo aumentaría directamente la neurotransmisión GABAérgica (Basile y Jones, 1997). Parece probable que el amonio, en las concentraciones que comúnmente se detectan en el FHF, contribuya a las manifestaciones de la encefalopatía ya sea potenciando la neurotransmisión GABAérgica o aumentando sinérgicamente la acción de los agonistas endógenos del receptor benzodiazepínico. Este concepto explica por qué algunos pacientes con encefalopatía tienen niveles normales de amonio y por qué, en otras circunstancias, no responden a los antagonistas del receptor de benzodiazepinas y racionaliza el tratamiento de la encefalopatía que está encaminado tanto a la disminución de los niveles de amonio como a la disminución del tono GABAérgico.

No sólo la encefalopatía, como desorden metabólico, afecta el nivel de consciencia de estos pacientes sino también el edema cerebral con aumento concomitante de la presión intracraneal (PIC). Generalmente progresa siguiendo cuatro etapas que van desde la confusión con alteraciones de la personalidad (grado I) hasta el coma (grado IV), pasando por el comportamiento inapropiado con sopor, letargia, ataxia y asterixis marcada (grado II). El grado III se caracteriza por estado de estupor, lenguaje inarticulado, respuesta sólo a órdenes simples, clonus, Babinski y rigidez. El aumento de la PIC es poco frecuente en pacientes con encefalopatía grados I/II; no obstante, en las etapas tempranas aumentaría el 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 grados III/IV (Lee, 1993; Atilasoy y Berk, 1995; Mas y Rodes, 1997). El edema cerebral puede conducir a herniación cerebral y muerte (25%). Existen dos hipótesis para explicar la patogenia:

la de la “glutamina” y la 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, 2005, 2008). El aumento de volumen de los astrocitos puede conducir al desarrollo de edema cerebral y es un hecho neuropatológico prominente en el FHF (Blei, 1991; Blei y cols., 1992; Norenberg y cols., 2007). La concentración de amonio cerebral está relacionada 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 (Larsen y cols., 1995a, 1995b; Strauss y cols., 1997, 1998) y en modelos experimentales (Dempsey y Kindt, 1982) indican que las arteriolas cerebrales están 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). A su vez, las citocinas son potentes estimuladores de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), por lo que el estado hiperdinámico de la circulación sistémica, el alto gasto cardíaco y la baja resistencia vascular pueden llevar a la producción de excesivas cantidades de óxido nítrico (NO) en el endotelio del enfermo con FHF (Schneider y cols., 1994). 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 (Cordoba y cols., 1999; Master y cols., 1999).

Según otros autores, el hígado necrótico también podría estar involucrado en la génesis de la hiperemia cerebral. Aunque, es posible que las citocinas u otros compuestos liberados por el hígado necrótico puedan contribuir a la vasodilatación cerebral, otras situaciones asociadas con la necrosis masiva del tejido hepático, como la pancreatitis, no están asociadas con edema cerebral.

2.1.2.2.- Alteraciones renales y del equilibrio 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, lo que agrava el pronóstico. Debido a la disminución de la síntesis de urea por el hígado, la azoemia no es un buen indicador de la función renal, y se prefiere la creatininemia (Ring-Larsen y Palazzo, 1981).

Algunos pacientes desarrollan necrosis tubular aguda vinculada al shock hipovolémico, bacteriemia y nefrotoxicidad inducidas por drogas, presentándose con un aumento de la natriuria y una orina isosmolar. No obstante, en la evolución, lo más frecuente (aproximadamente en el 50% de los pacientes) es el desarrollo de un fallo renal funcional, habiéndose descartado los factores prerrenales y la necrosis tubular aguda. Los riñones de estos pacientes son histológicamente normales o casi normales con la función tubular renal preservada de manera que el trasplante hepático 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 vasoconstrictores y vasodilatadores renales, a favor de aquéllos, secundario a la disminución del volumen circulante eficaz por vasodilatación periférica y esplácnica. Se ha demostrado a nivel neuronal un aumento de la actividad simpática con la existencia de un reflujo hepatorenal; en lo humoral, un aumento del sistema renina-angiotensina II-aldosterona, un aumento de la hormona antidiurética con refractariedad a la hormona natriurética auricular; y a nivel intrarrenal un aumento de la endotelina 1 con una disminución de la calicreína urinaria y una alteración de las prostaglandinas renales. De manera que, al igual que en los pacientes cirróticos con síndrome hepatorenal, 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 (Hoofnagle y cols., 1995; Ellis y Wendon, 1996; Lee, 1996). Esta forma de disfunción renal no remite a menos que exista una mejoría simultánea de la función hepática. El pronóstico del síndrome hepatorenal es desfavorable con una mortalidad del 90%.

Aproximadamente un 50% de los pacientes con FHF presentan signos clínicos asociados con hipertensión portal como ascitis y síndrome hepatorenal. 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 distorsión de la arquitectura hepática después de producirse la necrosis hepatocelular extensa (Navasa y cols., 1992).

La hipopotasemia se produce frecuentemente en las fases tempranas y puede desencadenar arritmias letales. La hiponatremia es la expresión bioquímica del aumento de retención de agua y la disminución de depuración del agua libre. Ello 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 inhibición de la secreción de esta hormona, así como su inhibición periférica por la demeclociclina y la expansión del volumen con plasma, aumenta la generación de agua libre. La hipernatremia puede seguir a la transfusión de grandes cantidades de plasma fresco, especialmente en ausencia de diuresis o con el uso de diuréticos osmóticos. La hipofosfatemia es común particularmente en casos de sobredosis por paracetamol (Valla y cols., 1989).

La alcalosis es un hallazgo frecuente en el FHF (Mizock y Falk, 1992). En etapas tempranas de la EH frecuentemente se observa 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.

También es precoz una alcalosis metabólica que puede deberse a la hipopotasemia o ser secundaria al fallo en la alcalinización de la orina. La aspiración gástrica puede potenciar este problema así como también la disminución de la natremia.

En la evolución 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.

2.1.2.3.- Alteraciones respiratorias

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

En relación con el parénquima pulmonar y del intercambio de gases, estos pacientes presentan una insuficiencia respiratoria tipo I, debido a una hipoxemia con normo o hipocapnia. La hipoxemia es secundaria a varios mecanismos: aspiración del contenido digestivo en las vías aéreas, edema pulmonar lesional, atelectasia por secreciones retenidas que no pueden expectorar, íleo pronunciado con ascenso diafragmático y neumonía, como complicación infecciosa. Se ha descrito un síndrome hepatopulmonar que consiste en la tríada: disfunción hepática más hipoxemia más dilatación vascular pulmonar (Castro y Krowka, 1996).

En la circulación, el patrón típico del FHF es muy similar al de la sepsis, con gasto cardíaco aumentado 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).

En la microcirculación se produce una disminución de la tasa de extracción de oxígeno con una diferencia arterio-venosa del oxígeno disminuida a pesar de la alta disponibilidad del mismo, lo cual favorece la lactoacidosis. La corrección de la macrocirculación con vasoconstrictores e inotrópicos, empeora la oxigenación tisular agravando la acidosis metabólica (Ellis y Wendon, 1996). Se pueden observar arritmias cardíacas incluyendo extrasístoles ventriculares, bloqueos y bradicardia, que pueden ser secundarias a alteraciones en la oxigenación del miocardio y aumento de la presión intracraneal.

2.1.2.4.- 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 protombina (TP) se halla prolongado, siendo éste un elemento pronóstico. El factor VII es el primero en disminuir por su vida media corta y se afecta poco con el aumento del catabolismo. 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 fibrinólisis 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 que se sitúan por debajo de 100.000/ μ l (Lee, 1993).

2.1.2.5.- Alteraciones metabólicas

Una situación frecuente en el FHF (en más del 40% de los casos) es la hipoglucemia, secundaria a la alteración de la gluconeogénesis y a los bajos niveles de glucógeno hepático (Lee y Williams, 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 que puede ser causa de íleo o distensión abdominal y de la hiperdinamia.

2.1.3.- Anatomía patológica

En la mayoría de los casos, se produce una necrosis masiva de los hepatocitos; no obstante, la insuficiencia hepatocelular sin necrosis es característica del hígado graso agudo del embarazo y del síndrome de Reye, sugiriendo que la muerte real de las células no es un rasgo universal o esencial. Ciertas condiciones como el daño inducido por disolventes orgánicos o la intoxicación por acetaminofeno afectan en particular a la

región centrolobulillar. En contraste, el hígado graso agudo se caracteriza por la acumulación de grasa microvesicular en las células intactas.

Vinculado con el patrón enzimático podemos hablar de dos tipos anatomopatológicos de lesión hepática en el FHF. En el tipo I aparecen áreas confluentes de necrosis hepatocitaria y se producen elevaciones marcadas 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* e 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; Lee y Williams, 1996).

2.1.4.- Fisiopatología

La gravedad y duración del FHF depende, por una parte, del grado de alteración de las actividades de síntesis, de biotransformación y de eliminación de endotoxinas resultantes de la pérdida de funcionalidad de los hepatocitos y las células de Kupffer, junto con los efectos sistémicos de los mediadores liberados por el hígado dañado y, por otra, de la velocidad y extensión a la que estos acontecimientos se ven equilibrados por la regeneración hepática. Diversas investigaciones sugieren que el daño hepático en el FHF es el resultado tanto de la acción directa del

fármaco, toxina, virus u otra causa, como de la liberación de citocinas de las células no parenquimatosas activadas, es decir, las células de Kupffer, las células estrelladas y las células endoteliales (Andus y cols., 1991; Rosser y Gores, 1995). La activación de estos tipos de células puede, además, reducir la microcirculación intrahepática en los sinusoides, exacerbando la isquemia local. También se ha indicado que los pacientes con FHF presentan bajos niveles plasmáticos de fibronectina, proteína que actúa como una opsonina no específica para las partículas circulantes, tales como desechos celulares, fibrina y bacterias, además de estar involucrada en la hemostasia. Esta disminución en su concentración se debería a un incremento en su consumo en el proceso de fagocitosis más que a una falta de síntesis en el hígado dañado (Almasio y cols., 1986).

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). La apoptosis está presente en el hígado tanto durante su desarrollo como en la etapa adulta. Durante la embriogénesis, la apoptosis es necesaria tanto para el desarrollo de las vías biliares como del parénquima hepático. El primitivo sistema biliar intrahepático se desarrolla a partir de una doble capa cilíndrica denominada lámina ductal. En estadios tardíos del desarrollo de la lámina ductal se observa un incremento de los niveles de Bcl-2 en comparación con los estadios más tempranos (Terada y Nakanuma, 1995). Posteriormente, en malformaciones en las que persiste la lámina ductal, se observó un descenso en el número de células apoptóticas así como un

incremento en los niveles de Bcl-2 comparándolos con fetos control de similares edades (Sergi y cols., 2000).

No se conoce demasiado sobre 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 como son las autoinmunes, hepatitis víricas crónicas, procesos hepáticos asociados al consumo de alcohol, procesos cancerígenos como el hepatocarcinoma y el colangiocarcinoma (Guicciardi y Gores, 2005; El Bassiouny y cols., 2008), y en la patogenia del FHF el cual se caracteriza por una incontrolada muerte masiva de hepatocitos (Leifeld y cols., 2006).

La apoptosis de los hepatocitos es el proceso más importante en el mecanismo molecular del fallo hepático (Togo y cols., 2004; 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 como son los inducidos por galactosamina más LPS (Arvelo y cols., 2002; Wang y cols., 2003), herpes simple (Hashimoto y cols., 2003) o concanavalina A (Trautwein y cols., 1998; Kim y cols., 2000). Sin embargo, no existen muchos datos sobre la trascendencia de la apoptosis en el FHF humano (Kasahara y cols., 2000; Streetz y cols., 2000; McGregor y cols., 2003; Rutherford y Chung, 2008).

2.1.5.- Mecanismos moleculares

Diversas investigaciones sugieren que el FHF es el resultado tanto de la acción directa del fármaco, virus o tóxico sobre los hepatocitos,

como de la liberación de citocinas por las células no parenquimatosas activadas, principalmente las células de Kupffer y células endoteliales. (Rosser y Gores, 1995; Malhi y Gores, 2008).

En el caso de las infecciones víricas la liberación de citocinas inflamatorias, como TNF- α , interleucinas (IL-1 e IL-6 principalmente) o IFN- γ , también se debe a los macrófagos circulantes o linfocitos T activados (Rutherford, 2007; Zeremski y cols., 2007; Ou y cols., 2008).

2.1.5.1.- Citocinas inflamatorias y Fas-L

Las citocinas son moléculas solubles no específicas que son producidas mayoritariamente por los leucocitos e intervienen en la regulación de las células del sistema inmune y en los procesos inflamatorios. Estas moléculas están implicadas en las respuestas frente a los agentes infecciosos, pero en ocasiones pueden ser responsables de los procesos patológicos. Las citocinas incluyen a las interleucinas (IL), linfocinas, interferones, monocinas y quimiocinas. Las quimiocinas son proteínas implicadas en la atracción específica de los leucocitos hacia tejidos en donde se está produciendo un proceso inflamatorio.

Las citocinas ejercen su función actuando sobre receptores específicos de membrana y contribuyen a la activación, blastogénesis y/o diferenciación en células efectoras, regulando también otros procesos como la apoptosis, adquisición de capacidad citotóxica y la recirculación de los leucocitos.

Los efectos y la síntesis de las citocinas no se limitan al sistema inmune, ya que se ha observado que estas moléculas pueden regular la función de las células de otros órganos y tejidos.

El TNF- α es una citocina pleiotrópica que existe de forma libre y como molécula de membrana. Está implicada en la respuesta inmunitaria del hospedador, en la inflamación y en la apoptosis. Se han descrito dos moléculas estrechamente relacionadas, el TNF- α y el TNF- β , con elevada homología en su secuencia aminoacídica. El TNF- α es una citocina producida fundamentalmente por los monocitos y los macrófagos en respuesta a antígenos bacterianos, tales como el LPS, que es la principal responsable del shock séptico asociado a bacteriemias. También puede ser producida por los linfocitos T y B, natural Killer (NK), fibroblastos y mastocitos. Junto con la IL-1 está implicada en los procesos inflamatorios derivados de los procesos infecciosos, elevando la temperatura corporal y produciendo caquexia y sueño al actuar sobre el SNC. Por otra parte, induce la expresión de moléculas de adhesión y estimula la producción de la IL-8 por las células del endotelio vascular, lo que contribuye a la extravasación de linfocitos, neutrófilos y monocitos. La liberación de TNF- α produce activación local del endotelio vascular, liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, que conducen al reclutamiento de las células inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento, provocando la activación de los linfocitos T y B. También aumenta la activación y adhesión plaquetaria y provoca oclusión vascular.

Las funciones del TNF- α se deben a su unión a dos receptores celulares que se localizan en diferentes células como neutrófilos, células endoteliales y fibroblastos. Cuando el TNF- α actúa a nivel sistémico sus

efectos son desastrosos provocando síndromes como el shock séptico y la CID. El TNF- α activa dos factores de transcripción: la proteína activadora-1 (AP-1) y el factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B). Ambos factores de transcripción se activan a través de la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs): quinasa amino-terminal c-Jun (JNK) y p38, y las I κ B quinasas, respectivamente (Hayakawa y cols., 2006).

El TNF- β o linfoxina, es producido exclusivamente por linfocitos T activados, aunque se une a los mismos receptores que el TNF- α e induce funciones similares.

La interleucina 6 (IL-6) es una citocina multifuncional que ha sido implicada en gran variedad de funciones celulares. Es una glicoproteína segregada por monocitos/macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, linfocitos T y células del estroma de la médula ósea. El gen que codifica para IL-6 está localizado en el cromosoma 7, su liberación está inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta al TNF- α . Es una citocina con actividad antiinflamatoria y proinflamatoria. Interviene en la producción de inmunoglobulinas, en la diferenciación de linfocitos B, activa a los linfocitos T citotóxicos, modula la hematopoyesis y es la responsable, junto con la IL-1, de la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado, en especial fibrinógeno.

El interferón (IFN) es una glicoproteína pleiotrópica producida por el sistema inmunitario de la mayoría de los animales con un papel antiviral, antiproliferativo, proapoptótico, proinflamatorio y de regulación de la respuesta inmunitaria. En los seres humanos hay tres tipos principales de interferón. El primer tipo está compuesto por 14 diferentes

isoformas del IFN- α , e isoformas individuales β , ω , ϵ , y κ . El segundo tipo consiste en el IFN- γ . Recientemente se ha descubierto una tercera clase de interfeferon, el λ , con 3 isoformas diferentes.

El interferón tiene 2 acciones básicas. Por un lado, impide la replicación en células infectadas que aún no han sido destruidas por la acción vírica, y por otro, activa las NK, capaces de reconocer células infectadas por virus y eliminarlas. La acción del interferón es mediada a través de la activación de la vía de señalización JAK/STAT (Stark y cols., 1998; Hosui y cols., 2003; Stark, 2007).

Fas (también denominado CD95) es una proteína de superficie celular con un dominio citoplasmático de "muerte celular" conservado. El ligando Fas (Fas-L o Apo-1) es una proteína de membrana tipo II miembro de la familia del TNF que está altamente expresado en linfocitos activados. Esta proteína está implicada en los mecanismos de la vía extrínseca de la muerte celular programada (Danial y Korsmeyer, 2004). Fas-L se une a Fas en la misma célula o células adyacentes, formándose grupos de tres o más moléculas de Fas. A causa de esta agregación, los dominios de muerte intracelulares de estos receptores agrupados por Fas se unen a una proteína adaptadora que contiene un dominio de muerte citosólico FADD (del inglés "dominio de muerte asociado a Fas"). FADD, por su parte, se fija a la forma inactiva de la caspasa-8 la cual experimenta una autoactivación catalítica y es entonces capaz de activar a otras caspasas efectoras y desencadenar la apoptosis. Esta vía de la apoptosis se llama muerte celular inducida por activación dado que se ve inducida por la activación receptor/ligando y no por la ausencia de estímulos de supervivencia (Danial y Korsmeyer, 2004).

2.1.5.2.- Moléculas de adhesión

La migración de células inmunitarias activadas antígeno-específicas a los tejidos diana donde se replica el virus está controlada por la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular que se unen a los ligandos de los linfocitos circulantes. En este contexto la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1), entre otras, es expresada en la superficie de las células endoteliales como respuesta a la presencia de citocinas circulantes, favoreciendo la adhesión de macrófagos y linfocitos T y su extravasación hacia el tejido diana donde se generará un foco inflamatorio (Wolf y cols, 2001; Ou y cols., 2008).

Por otra parte, la detección de esas citocinas inflamatorias por el hepatocito activa diversas vías de señalización, como las de las MAPKs, los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, la ruta JAK/STAT y genes proinflamatorios como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa inducible (COX-2). La activación de estas vías conlleva a su vez la expresión de nuevas citocinas inflamatorias, esta vez por la célula diana, el desencadenamiento de la apoptosis o en el mejor de los casos, la regeneración celular (Gao, 2005; Stepniak y cols., 2006; El-Bassiouny y cols., 2007).

2.1.5.3.- Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK)

La familia de las MAPKs representa un grupo de proteínas relacionadas con la transducción de una gran variedad de señales externas desencadenando, a su vez, múltiples actividades celulares, como la

diferenciación y proliferación celular o la expresión de genes proinflamatorios y proapoptóticos.

Aunque cada MAPK tiene sus características, todas ellas se caracterizan por seguir un mismo patrón conservado durante la evolución. Cada familia de MAPK está compuesta por un conjunto de tres quinasas que actúan secuencialmente: una MAPK, una MAPK quinasa (MAPKK) y una MAPKK quinasa (MAPKKK). La activación de la MAPKK se traduce en la fosforilación y activación de la MAPKK, que a su vez estimula la actividad MAPK a través de una doble fosforilación en treonina y tirosina. Una vez activada, la MAPK activa sus sustratos diana en residuos serina o treonina seguidos por una prolina.

Estímulo externo > MAPKKK > MAPKK > MAPK > Respuesta
--

La gran variedad de funciones de las MAPKs están mediadas por la fosforilación de varios sustratos, incluyendo fosfolipasas, factores de transcripción y proteínas citoesqueléticas. Las MAPKs catalizan a su vez la fosforilación y activación de diversas proteínas quinasas, denominadas proteínas quinasas activadas por MAPKs (MKs), que representan un paso adicional a nivel enzimático y de amplificación en las cascadas catalíticas de las MAPKs (Roux y Blenis, 2004).

En los mamíferos se han identificado tres MAPKs principales: las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2), la p38 y la quinasa amino-terminal c-Jun (JNK/SAPK). En términos generales las ERK están activadas por factores de crecimiento y mitógenos (EGF, HGF, IGF1 e insulina), mientras que tanto la p38 como la JNK están activadas por estímulos de citocinas (TNF- α , IL-6) o estrés oxidativo (Roux y

Blenis, 2004), por lo que se ha indicado que estas vías de señalización tienen efectos opuestos sobre la regulación de la apoptosis, señalando que JNK y p38 son mediadoras de la muerte celular (Kobayashi y cols., 2002; Wang y cols., 2004; Ma y cols., 2007), mientras que ERK1/2 promueve la supervivencia (Czaja y cols., 2003; Kuwabara y cols., 2008).

La cascada de las proteínas ERK consiste en unas MAPKKKs (A-Raf, B-Raf, y Raf-1), unas MAPKKs (MEK1, MEK2) y las indicadas MAPKs (ERK1 y ERK2). Están activadas principalmente por mitógenos y factores de crecimiento e implicadas en procesos de proliferación celular, por lo que su inhibición se ha considerado relevante como terapia anticancerígena. Su forma activada actúa sobre diferentes sustratos celulares, fosforilando proteínas de membrana, sustratos nucleares (como Elk-1, STAT3, c-Myc y c-Fos, entre otros), algunas proteínas citoesqueléticas, y varias MKs (Roux y Blenis, 2004). Varios estudios han demostrado su papel en la promoción de la supervivencia celular (Aoudjit y Vuori., 2001; Czaja y cols., 2003; Kuwabara y cols., 2008).

La MAPK p38 regula la expresión génica en respuesta a varios estímulos extracelulares como el TNF- α , Fas, lipopolisacárido (LPS) o hiperosmolaridad. En las señales mediadas por Fas o TNF- α , una quinasa reguladora de la apoptosis (ASK1) es la principal MAPKKK de p38. La p38 es activada por dos MAPKKs (MEK-3 y MEK-6), que la fosforilan en Thr-180 y Tyr-182. La p38 activada estimula la actividad de varios factores de transcripción junto con otras MKs (Yang y cols., 2002; Roux y Blenis., 2004).

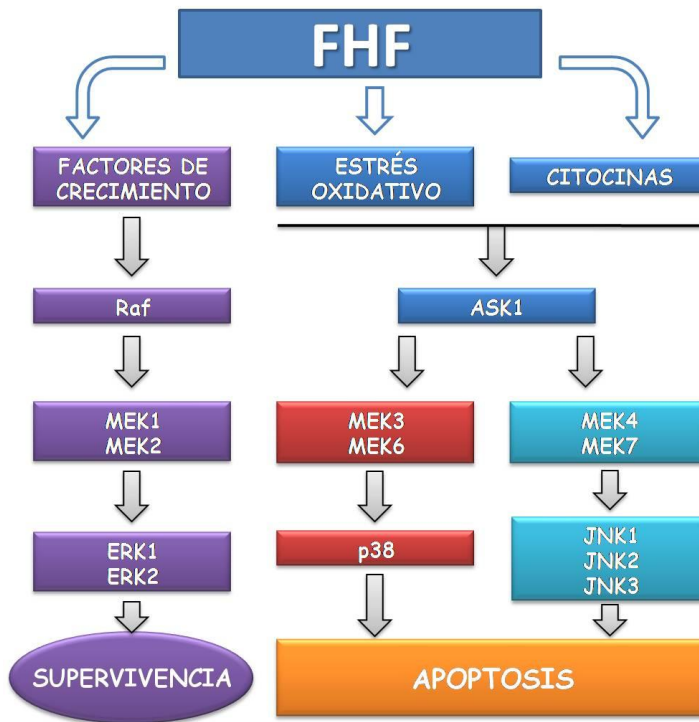


Figura 2.- Cascada de las MAPKs

Esta vía ha sido implicada en procesos de inflamación, apoptosis, hipertrofia de cardiomiocitos y diferenciación celular. Muchas señales de apoptosis estimulan la actividad de p38 (Jameel y cols., 2008).

Las MAPKs JNK (JNK1, JNK2 y JNK3) se unen al dominio NH2-terminal del factor de transcripción c-Jun fosforilándolo en Ser-63 y Ser-73, lo que causa un incremento de la actividad transcripcional. Se sabe que la activación de JNK desencadena apoptosis en respuesta a estreses ambientales, presencia de citocinas inflamatorias y TNF- α . Al igual que ERK y p38, la activación de JNK requiere una doble fosforilación en residuos tirosina y treonina. Las MAPKKs que catalizan tal reacción son conocidas como MEK4 y MEK7. Éstas son fosforiladas y activadas, a su

vez, por varias MAPKKs como MEKK1/4, MLK2/3, Tpl-2, DLK, TAO1/2, TAK1 y ASK1/2 (Roux y Blenis., 2004). JNK modula algunas proteínas de la familia Bcl-2 a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-translacional (Yu y cols., 2004). Su forma activa también puede fosforilar otros factores de transcripción tales como ATF-2, NF-AT, HSF-1, y STAT3. Sorprendentemente no se conoce ninguna proteína quinasa activada por JNK (Roux y Blenis., 2004).

2.1.5.4.- Vía de señalización PI3K/Akt

La quinasa lipídica “fosfatidil inositol 3 quinasa” (PI3K) está relacionada con la regulación de un gran número de procesos celulares tales como transcripción, migración, angiogénesis, crecimiento celular, proliferación, apoptosis y metabolismo de la glucosa.

La PI3K es activada por varias hormonas entre las que está incluida la insulina, por factores de crecimiento (EGF, IGF, PDGF, NGF, HGF), por señales derivadas de receptores de la matriz extracelular (integrinas), por estrés oxidativo o activación de Ras (Vivanco y Sawyers, 2002).

La PI3K fosforila fosfatidilinositoles de la membrana celular generando fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃) a partir de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂). En la membrana celular, el PIP₃, recluta tres proteínas quinasas (Akt, PDK1 y PDK2) que se unen a él. La Akt (proteína quinasa B –PKB-) es fosforilada por la PDK1 y PDK2 (serina-treonina quinasas dependientes de fosfolípidos). La fosforilación

de Akt permite su disociación de la membrana plasmática y su paso al citosol, núcleo u otros orgánulos donde fosforila otras proteínas.

A través de Akt, el PI3K regula numerosas funciones fisiológicas como la supervivencia y proliferación celular, la apoptosis y el metabolismo de la glucosa. Akt fosforila BAD, un miembro de la familia de las Bcl-2, y la caspasa-9. De esta forma inactiva estas proteínas y retrasa la apoptosis. También se ha descrito la regulación de la apoptosis por Akt mediante control transcripcional de genes pro- y antiapoptóticos (Burgering y Medema, 2003). Del mismo modo, Akt promueve la supervivencia mediante activación del NF- κ B y la transcripción de interferones, factores de crecimiento y proteínas inhibidoras de la apoptosis (Yang y cols, 2001; Manning y Cantley, 2007).

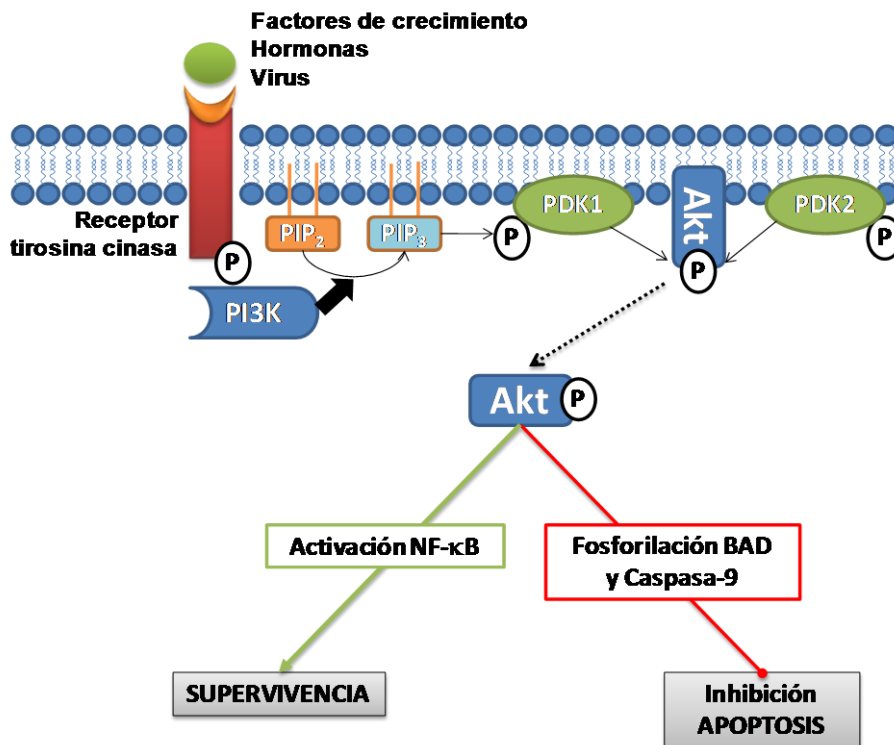


Figura 3.- Activación y funciones de la ruta PI3K/Akt.

2.1.5.5.- Factores de transcripción NF- κ B y AP-1

Un factor de transcripción es una proteína que participa en la regulación de la transcripción del ADN, pero que no forma parte de la ARN polimerasa. Los factores de transcripción pueden actuar reconociendo y uniéndose a secuencias concretas de ADN, uniéndose a otros factores, o uniéndose directamente a la ARN polimerasa.

Los factores de transcripción son estimulados por señales citoplasmáticas. Al ser activados adquieren la capacidad de regular la expresión génica en el núcleo celular, bien activando, bien reprimiendo la transcripción de diversos genes.

El NF- κ B es un dímero de miembros de la familia Rel de proteínas de unión al ADN caracterizado por la presencia de una secuencia N-terminal conservada de 300 aminoácidos, conocida como “dominio homólogo Rel”. En organismos eucariotas la familia de proteínas Rel incluye p50, p52, Rel, p65 y RelB. NF- κ B se refiere generalmente a un dímero p50/p65, que es el más abundante y el primero en ser descrito.

El NF- κ B fue descrito por primera vez en 1986 como un factor nuclear necesario para la transcripción de la cadena ligera kappa de las inmunoglobulinas en las células B. A día de hoy se reconoce en todos los tipos celulares (Ali y Mann, 2004).

El NF- κ B es un factor de transcripción ubicuo conservado desde *Drosophila* hasta el hombre. Se ha demostrado su papel en la regulación del sistema inmunitario, en la producción de citocinas inflamatorias, en el crecimiento celular y en la inflamación (Manna y Aggarwal, 2000). En ciertas situaciones actúa como una proteína antiapoptótica a través de la

inducción de genes de supervivencia (Sonenshein, 1997). También han sido relacionadas con un inapropiada regulación de NF- κ B las infecciones víricas (Arnulf y cols., 2002; Messmer y cols., 2002) y la fibrosis hepática (Mann y Smart, 2002; Wang y Cheng, 2008).

En condiciones normales el NF- κ B está localizado en el citosol como un dímero de proteínas (p50/p65) unido a una proteína inhibidora (I κ B). NF- κ B se activa por una gran cantidad de estímulos, desde la radiación ultravioleta, citocinas (como TNF- α o IL-1) o infecciones bacterianas o víricas. La presencia de estos factores provoca un aumento de las I κ B quinasas específicas (IKK α/β) que fosforilan I κ B y que provocan una rápida ubiquitinación y degradación del I κ B en el proteosoma. La desaparición del inhibidor provoca una translocación del complejo p50/p65 hacia el núcleo celular donde se une a una región específica (κ B) en la región promotora de los genes diana. De este modo, NF- κ B aumenta la expresión de genes inflamatorios que codifican para citocinas (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6 e IL-12, entre otras), quimiocinas (IL-8), factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular (VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina) (Zerfaoui y cols., 2008) y algunas proteínas de fase aguda como el amiloide sérico A (SAA). El NF- κ B también regula la expresión de enzimas proinflamatorias entre las que se incluyen la iNOS y la COX-2 (van den Berg y cols., 2001; Ali y Mann, 2004; Buzzelli y cols., 2008).

También el NF- κ B ha sido detectado en algunas patologías víricas donde juega un papel clave en la expresión de genes que codifican para moléculas importantes para la respuesta inmunitaria adaptativa, como las

proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Kopp y Medzhitov, 1999).

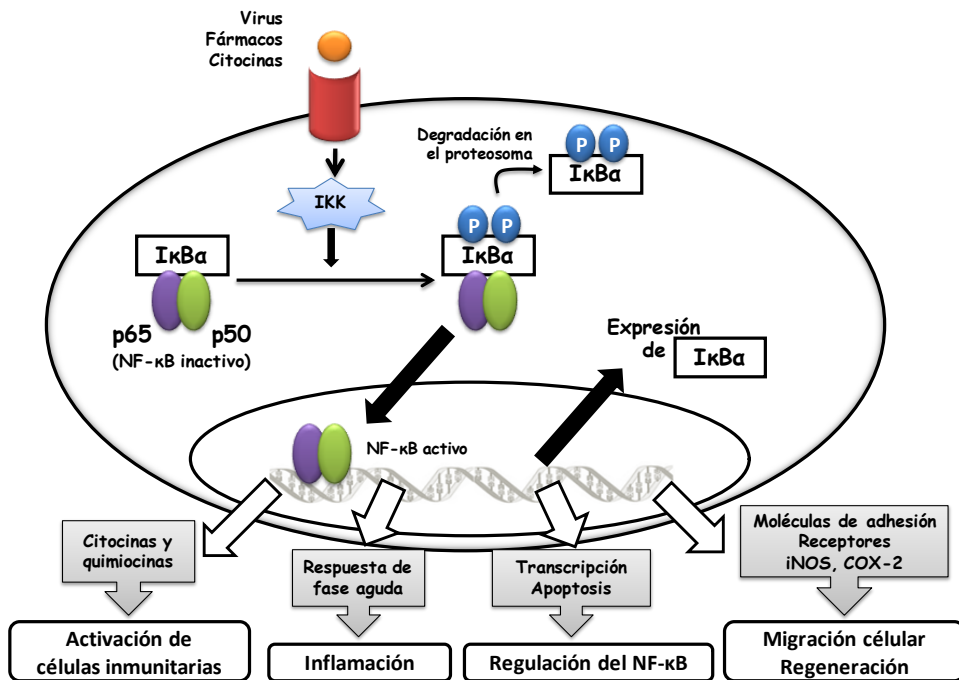


Figura 4.- Mecanismo de acción del factor de transcripción NF-κB.

Paralelamente, la proteína activadora 1 (AP-1) forma parte de un grupo de factores de transcripción de las familias de Fos y Jun. La forma predominante de AP-1 en la mayoría de las células es un heterodímero Fos/Jun con una gran afinidad por el sitio de unión de AP-1 al ADN (el homodímero Jun/Jun tiene una baja afinidad por este sitio) (Fujioka y cols., 2004). La actividad de AP-1 es inducida por una amplia gama de estímulos, entre los que se encuentran citocinas (TNF- α), factores de

crecimiento, neurotransmisores y radiación UV, a través de diversas vías de señalización.

La inducción del promotor Jun, es llevada a cabo por la quinasa JNK mediante fosforilación. Por otro lado la inducción de Fos se debe en parte a la activación de las MAPKs ERK y JNK y el grupo de las janus quinasas (JAKs) (Karin, 1995).

AP-1, mediante su unión al ADN, regula la expresión de genes que codifican para citocinas (TNF- α , ILs, Fas-L), iNOS y factores de crecimiento, entre otros.

Múltiples trabajos relacionan la activación de JNK y AP-1 con la apoptosis (Manna y Aggarwal, 2000; Taniguchi y cols., 2004; Lauricella y cols., 2006), pero también con la regeneración hepática mediada por la expresión de iNOS y consecuente liberación de NO. De hecho, se indica que la función de JNK en el hígado es la regulación de la muerte celular, mientras que c-Jun interviene activamente en la regeneración y supervivencia celular de forma sinérgica con NF- κ B (Hasselblatt y cols., 2007).

2.1.5.6.- Enzimas iNOS y COX-2

Las óxido nítrico sintasas (NOS) son una familia de enzimas responsables de transformar la L-arginina en óxido nítrico. Se han descrito tres isoformas, tres de ellas constitutivas (cNOS) y una inducible (iNOS). Entre las constitutivas se encuentran NOS1 (nNOS), constitutiva neuronal y NOS3 (eNOS), constitutiva endotelial. La tercera, NOS2, es inducible

(iNOS). Concretamente iNOS tiene funciones en el sistema inmunitario y en el circulatorio, donde provoca vasodilatación. Es utilizada por macrófagos en la respuesta inmunitaria contra patógenos, liberando óxido nítrico (Wei y cols., 2005). Su expresión es inducida por el factor de transcripción NF- κ B (Xie y cols., 1994) en respuesta a la estimulación de citocinas (TNF- α e IFN- γ) (Vila-del Sol y cols., 2007) o LPS (Stuehr y Marletta, 1987).

La COX-2 es una enzima clave en la transformación del ácido araquidónico en prostaglandinas. Es inducida por gran variedad de factores entre los que se encuentran citocinas, factores de crecimiento y promotores tumorales y ha sido implicada en procesos inflamatorios y carcinogénesis. También ha sido implicada como inhibidora de la apoptosis y como promotora de la angiogénesis (Crofford, 1997). También modula la función inmunitaria e incrementa la invasividad tumoral (Xu, 2002; El-Bassiouny y cols., 2007).

Se ha demostrado que algunos virus producen sobreexpresión de COX-2 en hepatocitos sugiriéndola como un mecanismo potencial en el desarrollo de la fibrosis en infecciones crónicas por hepatitis C (Leng y cols., 2003; Núñez y cols., 2004; Waris y Siddiqui, 2005).

La IL-1 es un potente inductor de la expresión de COX-2 a través del factor de transcripción NF- κ B (Crofford y cols., 1997).

2.1.5.7.- Vía de señalización JAK-STAT

La vía de señalización de las janus quinasas (JAKs) y las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STATs), resulta activada por más de 50 citocinas y factores de crecimiento. Ha sido implicada en gran variedad de funciones celulares en los sistemas hematopoyético, inmunitario, neuronal, y hepático.

En general, la unión de las citocinas antes mencionadas a sus receptores induce la dimerización del propio receptor, seguida de la activación de las tirosina quinasas asociadas al receptor, conocidas como JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2. Este complejo receptor-quinasa interactúa con los factores citoplasmáticos de transcripción de la familia STAT, que incluye STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5 y STAT6. Las STATs fosforiladas forman un dímero y se translocan al núcleo de la célula para activar la transcripción de muchos genes diana (Akira, 1999, Kisseleva y cols., 2002).

En el hígado, la STAT1 es activada preferentemente por el IFN- α/β y el IFN- γ . Está reconocido su papel clave en la defensa antivírica, inflamación, daño hepático y supresión de la regeneración hepática. La STAT2 es activada por el IFN- α/β y el IFN- λ y su principal función es la defensa antivírica hepática. Tras su activación, STAT1 y STAT2 forman heterodímeros u homodímeros que se translocan al núcleo para activar la transcripción de genes relacionados con proteínas antivirales, supresores tumorales o proteínas proapoptóticas (Gao, 2005). Se ha descrito que la vía IFN/STAT1 inhibe la expresión de iNOS y NF- κ B en células fibroblásticas, lo que redundaría en la supresión de la regeneración hepática (Ganster y cols., 2001).

La STAT3 es activada principalmente por la IL-6 y otras citocinas relacionadas y la IL-22. Su papel en el hígado va desde la respuesta de fase aguda, protección contra el daño hepático, homeostasis de la glucosa y el metabolismo lipídico, hasta la regeneración hepática. Además, otros factores pueden activar la STAT3 en el hígado, como la IL-10, el EGF y las proteínas víricas.

Varios genes inducidos por la STAT3 se identifican como importantes para el efecto mitogénico y hepatoprotector de la vía de IL-6/STAT3. Entre ellos, se incluyen Bcl-2, Bcl-xL, FLIP, Ref-1, ciclina D1, c-myc, etc. (Taub, 2003). Otro mecanismo que puede contribuir al papel hepatoprotector de IL-6 es la inhibición que produce sobre las células T NK (Sun y cols., 2004).

Por último, cabe señalar que la STAT3 puede ser activada en los hepatocitos mediante varias proteínas víricas de las hepatitis (Waris y cols, 2005). Del mismo modo, la activación de la STAT3 por especies reactivas de oxígeno (EROS) juega un papel importante en las hepatitis B y C y en la gran incidencia de carcinoma hepatocelular (HCC) en estas enfermedades (Gong y cols., 2001; Waris y cols., 2001; Machida y cols., 2006).

En cuanto a la STAT4, es necesario señalar que se activa principalmente por la IL-12. Se ha demostrado su activación en algún modelo de fallo hepático inducido por concanavalina-A e isquemia/reperfusión (Hong y cols., 2002; Kato y cols., 2002). Sin embargo, no está claro que el desarrollo del daño hepático por IL-12 esté mediado por STAT4 (Gao, 2005).

La STAT5 puede ser activada en el hígado por la hormona del crecimiento, que regula la expresión de varios genes hepáticos, entre los que se incluyen enzimas del metabolismo hepático y la propia hormona del crecimiento (Hosui y Hennighausen, 2008). En otro trabajo relativamente reciente, se hace referencia a que la falta del factor STAT5 conlleva problemas de hepatoesteatosis y disminución de la regeneración hepática (Cui y cols., 2007).

Por su parte, la STAT6, parece ser activada por las interleucinas IL-4, IL-12 e IL-13 en modelos de hepatitis inducida por concanavalina-A (Jaruga y cols., 2003) e inhibe la isquemia/reperfusión (Kato y cols., 2000).

Además, la activación de estos factores de transcripción es regulada por ellos mismos mediante la inducción de proteínas supresoras de la señal de citocinas (SOCS).

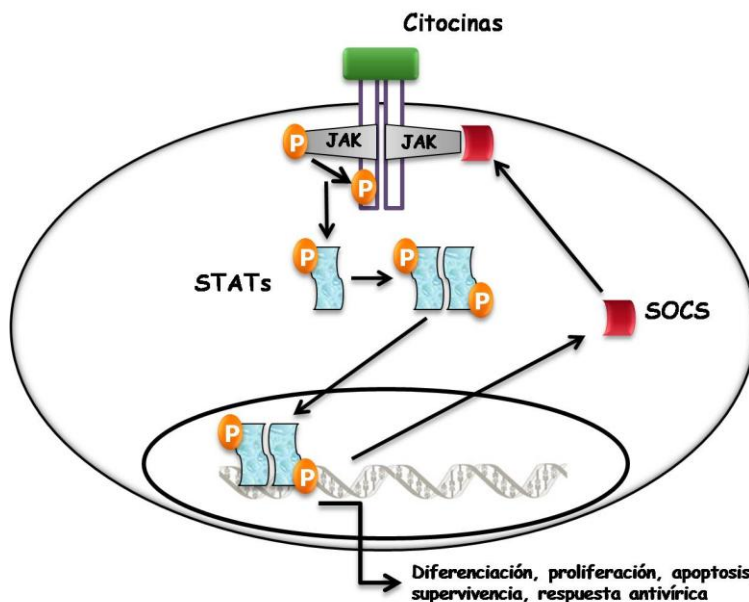


Figura 5.- Vía de señalización JAK/STAT y su regulación por las proteínas SOCS.

2.1.5.8.- Regulación de la vía JAK/STAT por las proteínas supresoras de la señal de citocinas (SOCS)

Las proteínas supresoras de la señal de citocinas (SOCS) fueron descritas inicialmente, como su nombre sugiere, como inhibidoras de la señal de citocinas. Hoy día sus acciones se extienden a otras vías intracelulares, aunque mantienen su papel como reguladoras negativas de la señal de citocinas y factores de crecimiento.

La señal iniciada por citocinas tiene lugar mediante interacción del ligando con receptores específicos trans-membrana. Tras esto se produce una dimerización del receptor que desemboca en una activación de las JAK quinasas asociadas y la consiguiente cascada de fosforilación intracelular, culminando con una apropiada respuesta celular. Sin embargo, esta cascada necesita un control celular preciso. En caso de pérdida de regulación puede desencadenar fenómenos tumorales y de inflamación crónica. Por eso no es sorprendente que existan múltiples mecanismos de control de la señal de citocinas, incluyendo las tirosina fosfatasas, la internalización de receptores e inhibidores específicos, entre los que se incluyen las PIAS (proteínas inhibidoras de la activación de las STATs) y los supresores de la señal de citocinas (SOCS) (Croker y cols., 2008).

La expresión de las proteínas SOCS puede ser inducida por estimulación de citocinas, regulando la señal no sólo como un clásico feedback negativo, sino regulando a su vez toda la cascada de señalización de otras citocinas mediante un proceso de comunicación cruzada (“cross-talk”). Pertenecen a una familia de proteínas con un dominio SH2 (SOCS1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y CIS). Mientras que la SOCS1 puede ser la típica

proteína SOCS, fue precedida históricamente por CIS (proteína inducible por citocinas que contiene SH2). CIS fue descubierto como un gen inducible por la IL-3 y se sugirió que inhibía la señal compitiendo por los sitios de unión en STAT5 con IL-3, EPO, prolactina, etc. (Matsumoto y cols, 1997; Croker y cols, 2008).

Las proteínas SOCS han sido implicadas en la regulación de más de 30 citocinas, incluyendo la IL-6, el factor inhibidor de leucemia (LIF), la leptina, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), la IL-10, la hormona del crecimiento y el IFN- β/γ .

La mayoría de los estudios relativos al mecanismo de acción de estas proteínas se centran en SOCS1 y SOCS3. Ambas proteínas bloquean la señal mediante inhibición directa de la actividad enzimática JAK. Varios estudios hacen referencia a la interacción de SOCS1 en residuos de fosfotirosina de la JAK quinasa, pero a su vez también puede interactuar directamente sobre los residuos fosfotirosina del receptor del IFN (Krebs y Hilton, 2000; Kile y Alexander, 2001; Cooney, 2002; Croker y cols, 2008)

2.1.5.9.- Importancia de 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, 1971). También conocida como muerte celular programada, a pesar de que algunos autores argumentan que no es un sinónimo apropiado (Sloviter, 2002), se caracteriza por grandes cambios morfológicos en la célula y

predominantemente en el núcleo. Es un mecanismo esencial para el correcto funcionamiento de los organismos multicelulares jugando un papel fundamental en una gran variedad de acontecimientos biológicos entre los que se incluyen la morfogénesis, procesos de recambio celular y la eliminación de células dañadas, infectadas por virus o envejecidas (Reed, 2001; Hashemi y Krocak, 2005). Sin embargo, la apoptosis también se ve involucrada en una gran variedad de patologías como en daños neurológicos agudos, procesos neurodegenerativos, enfermedades cardiovasculares, inmunológicas y en el cáncer (Antonsson y Martinou, 2000).

A pesar de que la apoptosis y la necrosis se consideran entidades totalmente distintas, un nuevo punto de vista considera que la apoptosis y la necrosis son con frecuencia consecuencia de los mismos factores desencadenantes y de las mismas vías de señalización (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. El proceso de apoptosis contribuye a la prevención de la replicación, diseminación y persistencia de los virus (Ghavami y cols., 2005; Fischer y cols., 2007).

En el proceso de apoptosis se aprecian cambios morfológicos y bioquímicos característicos pero, sin duda, una de las características más destacadas es la ausencia de respuesta inflamatoria. Sin embargo, la apoptosis hepatocelular en condiciones patológicas puede causar una reacción inflamatoria como consecuencia de un infiltrado de neutrófilos

resultado de la activación de células estrelladas y de la fibrosis hepática (Canbay y cols., 2004).

Desde el punto de vista morfológico se observan los siguientes cambios seriados y estereotipados (Patel y Gores, 1995; Kroemer y cols., 2008) (Figura 6).

- Contracción de la célula y disminución del volumen citoplasmático.
- Pérdida de contacto entre células próximas.
- Aparición del denominado “blebbing” en la membrana celular (protuberancias o “burbujas” en la superficie celular).
- Dilatación del retículo endoplásmico.
- Condensación de la cromatina.
- Fragmentación de la célula en múltiples vesículas rodeadas de membrana celular, conteniendo componentes citoplasmáticos y nucleares (“cuerpos apoptóticos”).

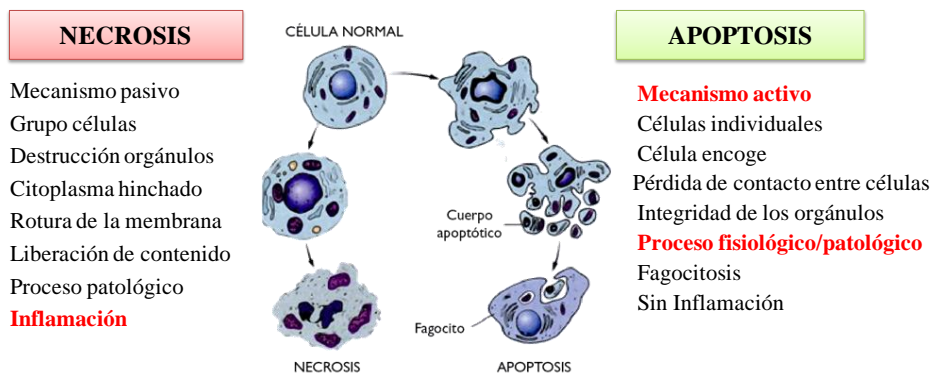


Figura 6.- Diferencias entre la muerte celular por apoptosis y por necrosis

El ADN de una célula apoptótica se encuentra a menudo fragmentado en unidades oligonucleosomales denominadas “laddering” de aproximadamente 180 a 200 pares de bases (pb) (Earnshaw, 1995).

Los cambios bioquímicos son más precoces y no completamente conocidos. El primer cambio detectado es una modificación en el potencial transmembrana mitocondrial que origina traslocación 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 (caspasas).

Las caspasas son un grupo de proteínas perteneciente al grupo de las cisteín-proteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que regula la ruptura de otras proteínas. En los mamíferos se conocen más de 14 caspasas de las cuales no todas intervienen en procesos de muerte celular; de hecho, algunas de ellas intervienen en los procesos inflamatorios. La primera proteasa encontrada en mamíferos se denominó ICE (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.

Las caspasas pueden ser incluidas en dos categorías:

- Caspasas iniciadoras: caspasas 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10 y 14 que son activadas por oligomerización y se caracterizan por poseer un pro-dominio largo y estar involucradas en funciones de regulación de la activación de la cascada.

- Caspasas ejecutoras: caspasas 3, 6 y 7 que son activadas por otras proteasas entre las que se incluyen las caspasas iniciadoras y que se caracterizan por poseer un pro-dominio corto y actuar al final de la cascada sobre los componentes celulares proteolizándolos.

El proceso de apoptosis puede ser iniciado por dos vías de activación (Figura 7):

Vía extrínseca. Esta vía se inicia por la implicación de alguno de los numerosos receptores de muerte situados en la superficie celular cuando sobre ellos actúa el correspondiente receptor. La gran mayoría de los receptores de muerte involucrados en esta vía pertenecen a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) que contiene un dominio citoplasmático implicado en las interacciones proteína-proteína que se denomina el dominio de muerte (DD) (Locksley y cols., 2001; Sukits y cols., 2001). Los receptores de muerte mejor conocidos son el receptor de TNF de tipo 1 (TNFR1) y la proteína Fas, muy relacionada con TNFR. Es una vía muy rápida y de escasa sofisticación basada en el reclutamiento de moléculas adaptadoras a través de sus DD, cuya única función es aproximar y activar a una caspasa iniciadora, la caspasa 8 o la caspasa 10 (Chinnaiyan y cols., 1995; Lavrik y cols., 2005), que a su vez activan por proteólisis a las caspasas ejecutoras o efectoras, tales como las caspasas-3 y 7. Esta vía de apoptosis puede inhibirse por una proteína denominada FLIP que se une a la procaspasa-8. Algunos virus y células producen FLIP y utilizan este inhibidor para proteger a la células infectadas y normales de la apoptosis (Moumen y cols., 2007; McCormick, 2008).

Vía intrínseca. En ella la mitocondria juega un papel clave experimentando los principales cambios que se producen durante la apoptosis. Los mecanismos por los que la mitocondria permite la salida de factores proapoptóticos aún no están aclarados. Uno de los mecanismos que permiten la activación de esta vía mitocondrial es el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa lo que provoca la apertura de poros, denominados poros mitocondriales de permeabilidad transitoria, que permiten la liberación de factores proapoptóticos localizados en el espacio intermembrana al citosol. Entre estos factores podemos destacar el Cit-c o el factor inductor de apoptosis (AIF) (Kluck y cols., 1997; Susin y cols., 1999).

Un segundo mecanismo es la generación de un cambio en el potencial transmembrana de la membrana mitocondrial interna lo que permite la apertura de canales en la membrana mitocondrial externa permitiendo la salida de proteínas localizadas en el espacio intermembrana (Green y Reed, 1998; Lartigue y cols., 2008). La liberación de estos factores al citoplasma está a su vez regulada por la familia de proteínas Bcl-2 (Green y Reed, 1998; Korsmeyer, 1999; Willis y cols., 2003; Landshamer y cols., 2008). La liberación del Cit-c al citosol conduce a la formación de una estructura heptamérica denominada apoptosoma. Se trata de un complejo de alto peso molecular formado por el Cit-c, la proteína adaptadora (Apaf-1) y dATP. Apaf-1 se oligomeriza lo que provoca un reclutamiento simultáneo de la procaspasa 9 que permite su activación (Zou y cols., 1999; Bao y Shi, 2007).

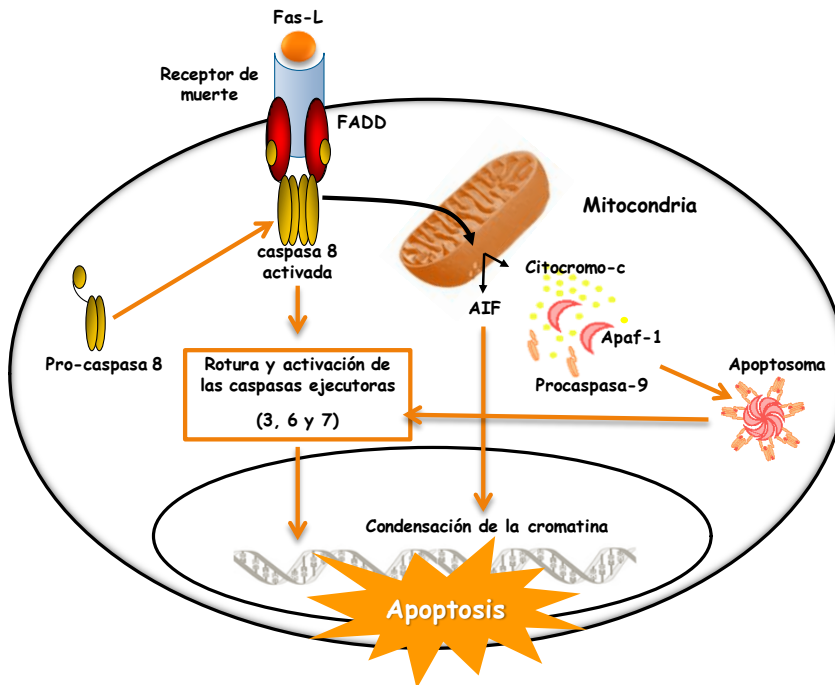


Figura 7.- Vías de la apoptosis

2.1.6.- Diagnóstico

La EH junto a la aparición de una coagulopatía en el contexto de una enfermedad hepática aguda, definen la presencia de una insuficiencia hepatocítica aguda. Dicho de otra forma, el diagnóstico del FHF se basa en la presencia de 2 ó 3 aspectos clínicos: ictericia y encefalopatía, junto con algunos datos bioquímicos: aumento de la BR total a expensas de la directa, prolongación del TP (<50%) y disminución del nivel plasmático del factor V. En general, la prolongación del TP por debajo del 50% precede en horas o semanas a la aparición de encefalopatía clínicamente evidente (Caraceni y VanThiel, 1995; Mas y Rodes, 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 poca o 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).

2.1.7.- 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 en base al análisis de 635 pacientes comprendidos entre 1972 y 1985 proponen tres categorías (O'Grady y cols., 1993):

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.

3.- Fallo hepático subagudo: cuando la encefalopatía se produce entre las 5 y las 12 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 trasplante hepático (7% de supervivencia) a diferencia del primer grupo (36% de supervivencia) en donde el tratamiento médico adquiere mayor importancia. 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 2 semanas desde la aparición de 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 difieren: 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 son 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 (Lee y Williams, 1996; Assy y Minuk, 1997).

2.1.8.- Tratamiento

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

El tratamiento médico va dirigido a proporcionar a estos pacientes medidas de apoyo, sin que se produzca deterioro yatrogénico alguno, hasta que se recuperen de manera espontánea o se proceda al TH. A la hora de considerar el tratamiento médico se debe tener en cuenta tres máximas fundamentales: 1) la regeneración hepática es el objetivo fundamental y debe intentarse por todos los medios, 2) hay que seguir exhaustivamente el curso de la enfermedad y repetir periódicamente valoraciones pronósticas y 3) 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). El tratamiento de este síndrome no puede depender de la atención primaria, urgencias, emergencias, sala de hospitalización o sala de cuidados intermedios. Es necesaria la atención de estos enfermos de

entrada en una Unidad de Cuidados Intensivos, tanto mejor cuanto más experiencia tenga con pacientes de este tipo, y con habilidad para el tratamiento del fallo multiorgánico, ya que cuanto mayor sea la experiencia, será factible mayor fidelidad en la valoración pronóstica (Tygstrup y Ranek, 1986).

El tratamiento médico consta de un apoyo nutricional adecuado con dextrosa hipertónica y un preparado multivitamínico del grupo B, además de potasio, fósforo y magnesio. La ingesta diaria de agua y sodio se ajustará de acuerdo con las disfunciones neurológicas, hemodinámicas y renales (Gecelter y Comer, 1995; Chanda y Mehendale, 1996).

Por otra parte, un aspecto crucial en el tratamiento de FHF lo constituye el manejo de la insuficiencia renal. La oliguria hace necesario, en un principio, proceder al relleno vascular mediante solución de albúmina humana. Posteriormente puede ser un factor importante que contribuya a elevar la presión intracraneal. La diálisis no es por sí misma un tratamiento eficaz porque puede eliminar factores plasmáticos solubles que intervendrían en la regeneración hepática (Mas y Rodes, 1997).

La encefalopatía y el edema cerebral son las causas más frecuentes de muerte en estos pacientes debido al enclavamiento cerebral producido por el aumento de la PIC. En este sentido, los trastornos metabólicos que son potencialmente perjudiciales para la función cerebral, como la hipoxemia, hipoglucemia, hiponatremia, hipofosfatemia y acidosis metabólica, deben prevenirse y corregirse (Jalan, 2005).

El manejo de los trastornos metabólicos obliga a monitorizar cuidadosamente las cifras de glucemia para detectar y corregir las

hipoglucemias, que son asintomáticas la mayoría de las veces. Hay también que corregir la hipofosfatemia. Si existe acidosis metabólica hay que diagnosticar y tratar los factores desencadenantes y perfundir bicarbonato sódico o recurrir incluso a hemodiálisis (Lee y Williams, 1996).

Debido a que los trastornos de la coagulación constituyen el elemento pronóstico más valioso en la insuficiencia hepática, no deben ser corregidos si no hay hemorragias. La trombopenia obliga algunas veces a transfundir plaquetas junto con pequeñas cantidades de heparina para impedir que aumente la CID. Se ha recomendado prevenir las hemorragias gastrointestinales con antiseoretos tipo antagonistas H₂, aunque el sucralfato es tan eficaz como los antagonistas H₂ en cuanto a prevenir hemorragias digestivas relacionadas con el estrés (Lee y Williams, 1996).

Las infecciones y la sepsis son otra causa importante de muerte. Recientemente se han asociado valores bajos de fibronectina en plasma con una mayor mortalidad del FHF al relacionarse directamente con una mayor incidencia de infecciones llegando incluso a suponer un 75% de las muertes si no se trata correctamente. La bacteriemia y las infecciones bacterianas parenquimatosas deben tratarse con los antibióticos adecuados. Los aminoglucósidos están contraindicados a causa de que su nefrotoxicidad aumenta por la insuficiencia hepática. Las infecciones micóticas, requieren tratamiento antifúngico en los pacientes con cultivos positivos procedentes de lugares significativos (Rolando y cols., 1993; Rolando y cols., 2000).

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 TGF- β en un modelo de FHF en ratas provocado por tetracloruro de carbono, aumentó la regeneración de forma clara (Armendariz-Borunda y cols. 1993). El agente antimicrobiano ciprofloxacino también aumenta significativamente la actividad de regeneración hepática en un modelo de FHF en rata (Kaita y cols., 1998).

En la regeneración hepática están implicadas una compleja red de citocinas y factores de crecimiento que actúan de una manera ordenada, la anfiregulina, un factor de crecimiento, se ha observado que 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). Recientemente se ha observado que la proteína caveolina-1 es esencial para la regeneración hepática ya que está implicada en la acumulación y regulación del metabolismo de los triglicéridos (Fernández y cols., 2006; Frank y Lisanti, 2007). Si bien en cultivos celulares también se han demostrado estos efectos, para algunos autores las aplicaciones de la caveolina-1 en el proceso de regeneración hepática son mínimas (Mayoral y cols., 2007). Del mismo modo, se ha descrito el papel de la cardiotrofina-1, una citocina 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 fallo hepático fulminante (Bustos y cols., 2003; Marquès y cols., 2007).

El TH constituye hoy en día el único tratamiento curativo del FHF (Oertel y Shafritz, 2008). Suele realizarse el trasplante hepático ortotópico (THO) y, debido a las condiciones de emergencia, pueden usarse injertos

incompatibles desde el punto de vista del sistema ABO. Solo se han descrito algunos casos de trasplante de hígado heterotópico. Más del 12% de los trasplantes que se realizan son debidos a un FHF; los rangos de supervivencia de estos pacientes son de un 75-90% (O'Grady, 2005). El principal requisito previo para el TH en los pacientes afectos de FHF es llegar a un pronóstico individual exacto, con el fin de trasplantar precozmente a los pacientes que, en otro caso, fallecerían y, por el contrario, no realizar el trasplante en aquellos otros que vayan a sobrevivir espontáneamente. Esta decisión tienen que tomarla hepatólogos con experiencia en pacientes afectados de FHF. A pesar de los excelentes resultados obtenidos con el TH en el FHF, es preciso tener precaución por dos motivos esenciales. En primer lugar, se han apreciado casos de recuperación espontánea en pacientes comatosos en los que se había decidido el TH. Estas recuperaciones inesperadas hacen imposible asegurar que algunos pacientes podrían haber evitado el trasplante. En segundo lugar, se desconoce todavía el pronóstico a largo plazo de la inmunosupresión continuada, así como el riesgo real de linfomas o neoplasias al cabo de 20 o más años en estos sujetos trasplantados. Probablemente, los criterios que más se adecúan a la selección de pacientes en nuestro medio, son los utilizados por el King's College Hospital (O'Grady y Williams, 1989).

Debido a la cada vez mayor demanda de órganos para el trasplante y la escasez de éstos, se han desarrollado técnicas para mejorar la utilización de estos órganos y para emplear un mismo órgano entre dos receptores. Así, se han mejorado las técnicas de trasplante hepático auxiliar, de hígado dividido y trasplante hepático de donante vivo relacionado. El trasplante hepático auxiliar consiste en que el lóbulo

hepático derecho o izquierdo del hígado del donante se trasplanta mientras que el hígado nativo se mantiene en su lugar. Cuando este hígado se recupera del daño y se ha regenerado completamente, el injerto puede extraerse o se puede cesar el tratamiento inmunosupresor. De esta forma, se evita la inmunosupresión durante toda la vida y la potencial toxicidad medicamentosa. El trasplante de hígado dividido consiste en que un hígado puede ser utilizado por dos receptores, generalmente adulto y niño. El procedimiento requiere dividir el hígado en sus lóbulos derecho e izquierdo. El trasplante hepático de donante vivo relacionado consiste en que uno de los padres cede al niño el lóbulo izquierdo o el segmento lateral izquierdo de su hígado. Este método permite que el trasplante sea rápido y el órgano de gran calidad (Metselaar y cols., 1990; McCarthy y Wilkinson, 1999; Belghiti y cols., 2004; O'Grady, 2007).

En los últimos años se han desarrollado una serie de técnicas y tratamientos tales como los sistemas artificiales de apoyo hepático, así como el trasplante de hepatocitos que es 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; Ito y cols., 2008). En numerosos estudios previos los hepatocitos aislados de hígados de cadáveres fueron infundidos a pacientes afectados de FHF a la arteria esplénica o a la vena porta mejorando tanto los niveles de amonio como el TP (Strom y cols., 1997; Bilir y cols., 2000).

Los sistemas de apoyo hepático se pueden clasificar según su forma de actuar en dispositivos físico-químicos, biológicos y mixtos. Los físico-químicos consisten en sistemas de hemoperfusión con láminas de carbón activado cubierto de albúmina al cual se le han agregado resinas sintéticas neutras o de intercambio aniónico junto con geles de agarosa.

También se han desarrollado membranas de hemodiálisis modificadas con mayor permeabilidad. Los biológicos consisten en plasmaféresis de alto volumen o dispositivos conteniendo hepatocitos aislados o componentes hepáticos. Existen dos sistemas de soporte hepático extracorpóreo mixto donde se utiliza tejido biológico combinado con materiales no biológicos: 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 (Kjaergard y cols., 2003; Gerlach y cols., 2008; Stadlbauer y cols., 2008).

2.2.- Modelos animales de fallo hepático fulminante

Existen pocas condiciones en medicina que sean más graves y desalentadoras que el FHF. Tanto el conocimiento como el tratamiento de este síndrome han estado limitados por la falta de modelos animales satisfactorios. Así han sido muchos los intentos de desarrollar un modelo adecuado y reproducible 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 hepatectomía completa y la utilización de sustancias hepatotóxicas tales como el acetaminofeno, azoximetano, concanavalina A, sulfoximina butionina, galactosamina y anatoxina-endotoxina, entre otras. Sin embargo, hasta el momento actual no se ha descrito un modelo sencillo que refleje de modo idóneo el patrón de la enfermedad humana de FHF y los que se utilizan presentan limitaciones importantes (Tuñón y cols., 2007).

El modelo ideal debería presentar criterios clínicos y bioquímicos bien definidos que, como los criterios pronósticos del King Collage para el FHF (O'Grady y Williams, 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 del FHF y las dificultades que supone la investigación en pacientes, hacen que los modelos animales tengan un papel fundamental en los estudios futuros.

Un modelo ideal de FHF, según criterios ampliamente reconocidos por la comunidad científica, 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, esto es, conducir a la muerte en un periodo de tiempo determinado y que la extensión del daño hepático pueda ser medible y estandarizable. Además la muerte debe producirse por FH, 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; por consiguiente, los animales no tratados deberían morir con signos de fallo hepático progresivo en un periodo de tiempo conocido. Además, el animal debe ser de 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. Y finalmente todos los métodos utilizados deben presentar el menos 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 por Mann en 1921 (Mann, 1921). En cerdos se describió un modelo potencialmente reversible, que combina la hepatectomía parcial (70%) con la derivación portocava y 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 (Fukueda y cols., 2006; Tuñón y cols., 2007).

Se ha podido establecer en ratas que una resección del 95% del hígado es un buen modelo de FHF 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.

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.

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 y en cerdos como modelo reproducible para comprobar la eficacia y función de diversos sistemas temporales de soportes hepáticos (Tuñón y cols., 2007).

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 o para la constatación del efecto de sustancias antioxidantes tales como la N-acetilcisteína.

Para comprobar la eficacia de diversos sistemas de soporte tanto artificiales como bioartificiales se utilizan con frecuencia animales como el cerdo al que se le induce un FH mediante la isquemia del órgano por derivación portocava y ligadura de la arteria hepática o mediante desvascularización total.

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. Recientemente, se ha desarrollado un modelo porcino en el que se combina una resección del 75-80% del hígado después de un periodo de isquemia.

En estudios realizados sobre 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 (Tuñón y cols., 2007).

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 y existen 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 encefalopatía hepática y el edema cerebral del FHF del hombre. A pesar de ello el uso de sustancias químicas hepatotóxicas se ha

utilizado y se usa con frecuencia como modelo de FHF (Tuñón y cols., 2007).

El acetaminofeno (paracetamol) es un fármaco de uso común y que puede causar daño hepático. Recientes estudios proponen que la apoptosis juega un papel clave en la inducción de fallo hepático por acetaminofeno. 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 destoxicación del fármaco relacionadas con la especie y con la edad. Otros aspectos importantes que no se han estandarizado en estos modelos y que conlleva resultados diferentes son la dosis óptima del fármaco y la vía de administración.

La D-galactosamina es una sustancia que es metabolizada por la vía de la galactosa en el hígado, mediante la depleción de diversos intermediarios intracelulares de uridina, produce graves alteraciones en el metabolismo del ARN de los hepatocitos y finalmente la necrosis hepática por lo que se ha utilizado para desarrollar modelos de FHF. Los resultados obtenidos no son muy homogéneos, el intervalo entre el daño infringido a los animales y la muerte presenta muy poca uniformidad, es un producto caro para emplearlo en grandes animales y finalmente carece de inocuidad.

El uso de tetracloruro 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 (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 y solamente ratones transgénicos que sobreexpresan las proteínas del virus de la hepatitis C (VHC) o ratones BALB/c infectados con el virus de la hepatitis del ratón tipo 3 (MHV-3) han ofrecido alguna luz sobre los mecanismos del FHF inducido por virus. Sin embargo, estos modelos murinos tienen limitaciones significativas en lo que hace referencia a la ausencia de medidas de la presión intracraneal, la principal causa de muerte en el FHF humano, o en los datos sobre las toxinas implicadas en la encefalopatía hepática y el edema cerebral además del pequeño tamaño de los modelos que hacen imposible la prueba de nuevos sistemas de soporte hepático (Tuñón y cols., 2007).

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 (RHDV) (Tuñón y cols., 2003). En este modelo se reproducen los parámetros bioquímicos e histológicos y los signos clínicos más representativos del FHF del hombre. Se detecta un aumento significativo en las actividades plasmáticas de las transaminasas, lactato deshidrogenasa y la concentración de bilirrubina (BR). 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 encefalopatía hepática, coma y muerte cerebral. Asimismo, se indican incrementos significativos en la expresión de la iNOS y del TNF- α 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 la apoptosis; su sobreexpresión se correlaciona 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 virus de la RHD 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).

2.3.- La Enfermedad hemorrágica del conejo como modelo de fallo hepático fulminante

La Enfermedad hemorrágica del conejo (RHD) es una enfermedad aguda, contagiosa y mortal tanto para los conejos salvajes como domésticos europeos (*Oryctolagus cuniculus*), con una tasa de morbilidad y mortalidad entre el 90 y 100% en conejos adultos.

La enfermedad fue descrita por primera vez en Jiangsu (China) en 1984 (Liu y cols., 1984), tras la introducción de conejos de Angora

procedentes de Alemania. En 9 meses, esta enfermedad mató 14 millones de conejos domésticos en China. Actualmente se encuentra inscrita en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) bajo la denominación de “Enfermedad hemorrágica del conejo” (en inglés, “rabbit hemorrhagic disease” –RHD-).

2.3.1.- Etiología

Después de años de etiología confusa, el virus responsable de la RHD ha sido clasificado como un miembro del género *Lagovirus*, dentro de la familia Caliciviridae (Parra y Prieto, 1990; Ohlinger y cols., 1991; Green, y cols., 2000).

La única especie receptiva es el conejo, aunque está emparentado muy estrechamente con el virus del Síndrome de la liebre parda europea (EBHS), que produce síntomas parecidos en la liebre (Fuchs y Weissenbock, 1992; Lavazza y cols., 1996). Se han identificado muchas cepas que parecen circular en las poblaciones de conejos salvajes, aunque sólo se conoce un serotipo con 2 subtipos principales: virus de la RHD y virus de la RHD subtipo “a”.

Es un virus ARN monocatenario de polaridad positiva, sin envuelta, con una cápside icosaédrica de 40 nm compuesta principalmente por una proteína estructural de 60 kDa (VP60) (Granzow y cols., 1996). Es estable en el medio ambiente, donde se disemina fácilmente. Se elimina en heces y secreciones nasales de los conejos infectados. La infección se puede producir tanto por vía oral como respiratoria, mediante contacto directo animal-animal o por medio del alimento, agua o vectores.

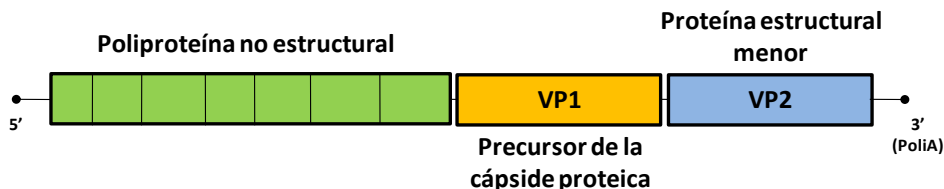


Figura 8.- Genoma del virus de la Enfermedad hemorrágica del conejo.

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 fibrinólisis, provocando el desarrollo de una CID, lo que se plasma en la presencia 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; si bien la grave necrosis hepática sería 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 (Duff y cols., 1994) 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. Este hecho es característico de ciertas formas de hepatitis (“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 (Purcell y Ticehurst, 1988). 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 encefalopatía hepática 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 (Alonso y cols., 1998). La apoptosis de los hepatocitos produce una destrucción parenquimatosa extensa que causa una hepatitis fulminante letal que es característica de la RHD. Toda vez que las células

apoptóticas son los lugares de una aumentada actividad procoagulante, la apoptosis de estas poblaciones celulares podría constituir el primer paso en la patogenia la CID y una vía común a otras enfermedades hemorrágicas víricas. Las células apoptóticas pueden encontrarse en diversos tejidos de conejos infectados por el virus de la RHD 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

La enfermedad puede evolucionar de forma sobreaguda, aguda, subaguda y crónica. La forma de presentación más frecuente es la aguda. En un brote, entre un 5 y un 10% de los animales presentan formas subagudas o crónicas.

El periodo de incubación oscila entre las 24, hasta como máximo las 72 horas, y la muerte puede presentarse en las 12-48 horas posteriores a la repentina aparición de varios signos clínicos.

La forma sobreaguda está caracterizada por la muerte repentina de los animales sin apenas signos previos.

La forma aguda está caracterizada por signos clínicos compatibles con los de una encefalopatía hepática. Se presentan signos generales como anorexia, fiebre y signos de encefalopatía como apatía, insensibilidad al medio circundante, postración, decúbito lateral, signos nerviosos (convulsiones, contracciones, ataxia, parálisis posterior, pedaleo, opistótonos), signos respiratorios (disnea, epistaxis o descarga muco-

hemorrágica nasal), signos oculares y hemorragias por aberturas corporales, antes de la muerte. Los animales que se recuperan de la forma aguda a veces muestran ictericia grave, sobreviniéndoles la muerte a las pocas horas (Xu y Chen, 1989). 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 de un fuerte chillido. También se observa en algunos animales ataxia y parálisis del tercio posterior cuando se intenta colocarlos en una postura natural (Argüello y cols., 1988). Todas estas manifestaciones clínicas indican la existencia de una afectación del sistema nervioso central. La muerte súbita se produce como consecuencia de un fallo múltiple pluriorgánico derivado del edema y de la congestión pulmonar, necrosis adrenocortical, desórdenes circulatorios, renales y necrosis hepática.

La forma subaguda se caracteriza por signos clínicos similares a los de la forma aguda pero de naturaleza más moderada y de más largo tiempo de evolución.

Finalmente en la forma crónica los animales que sobreviven a la enfermedad muestran hipertermia, depresión y anorexia transitoria y seroconvierten entre los 4 y 6 días postinfección.

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. La necrosis hepática, la esplenomegalia, junto con una coagulopatía que origina la presencia de hemorragias generalizadas, son las lesiones más frecuentes.

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 en forma de petequias y equimosis en la mayor parte de los órganos. 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.

Las lesiones más frecuentes se localizan en el hígado que siempre está afectado. En las formas de presentación aguda, el hígado está hipertrofiado, friable y tiene una coloración gris-amarillenta; mientras que, en las formas sobreagudas el hígado está hipertrofiado, presenta 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.

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). 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., 1988; 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, etc.) y microtrombos, siendo estos últimos muy frecuentes en los capilares de los glomérulos renales (Rosell y cols., 2002).

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Aparatos

Los medios instrumentales utilizados en el presente estudio han sido los siguientes:

- Autoclave: Raypa, modelo Sterilmatic.
- Balanzas de precisión: Sartorius, modelo 135925.
Sartorius, modelo R200D.
- Baños termostáticos: Selecta, modelo 135925.
Selecta, modelo CE95.
Selecta, modelo Unitronic 32.
- Centrífugas: Beckman, modelo XL-100K. Rotor 70:1 Ti.
Eppendorf, modelo 5451C.
Sorvall, modelo RC-5B.
- Cubeta electroforesis vertical: BioRad, MiniProtean 3 cell
- Desecador de geles: BioRad 583
- Espectrofluorímetro: Hitachi, modelo F-2500.
- Espectrofotómetro: Hitachi, modelo U-2000.
Milton Roy, modelo Spectronic 2001.
- Escáner para diapositivas: Nikon LS-30®.
- Fuente de alimentación: Bio-Rad modelo 200/2.
- Granatario: Sartorius, modelo 1216 MP.
- Homogeneizador: Polytron.
- 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 Provisé AX 70®.
- Microtomo de rotación: Leitz 1512.
- Película para diapositivas: Ektachrome 100 ASA.
- pHmetros: Crison, modelo 2001.
Meteor, modelo 991 A.
- Sistema de transferencia de proteínas: BioRad,
Transblot SD

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:

- Pentobarbital sódico (Sigma Chemical Co, San Louis, USA) se disuelve en solución salina hasta una concentración final de 5 mg/ml.
- Suero salino fisiológico (SSF): NaCl 154 mM.
- PBS: NaCl 0,14 M; KH_2PO_4 1,4 mM; NaHPO_4 8 mM; KCL 2,7 mM.

- Solución de Alsever (Sigma Chemical Co, San Louis, USA): 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 cuarenta y dos conejos machos de raza Nueva Zelanda Blanca de 9-10 semanas de edad con un peso comprendido entre los 2 y los 2,5 kg. Los animales se mantuvieron en jaulas individualizadas con comida y agua “*ad libitum*” en una habitación climatizada a 22°C con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Durante una semana se les mantuvo en período de aclimatación.

3.4.- Diseño experimental

3.4.1.- Obtención del inóculo vírico

El inóculo vírico (cepa AST/89) para la infección experimental se preparó a partir de hígados de animales recién muertos previamente inoculados con el virus de la RHD. Los hígados se homogeneizaron al 10% en PBS a pH 7,2 y se sometieron a dos centrifugaciones sucesivas (500 xg durante 20 minutos y 6.000 xg durante 30 minutos). El sobrenadante se filtró a través de un tamaño de poro de 0,2 μm , y se conservó en alícuotas a -80°C.

3.4.2.- Titulación del virus

Para titular el virus de la RHD empleamos la técnica de hemoaglutinación. Se dispensaron 50 μ l de SSF en todos los pocillos y 50 μ l del sobrenadante filtrado del homogeneizado de tejido hepático en el primer pocillo. Posteriormente, se realizaron diluciones dobles seriadas en placas de microtitulación de fondo en “V” y se añadieron 50 μ l de una disolución de glóbulos rojos en PBS al 0,5% en todos los pocillos. Se utilizaron glóbulos rojos humanos del tipo 0, 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 película plástica adhesiva para evitar la evaporación 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 9).

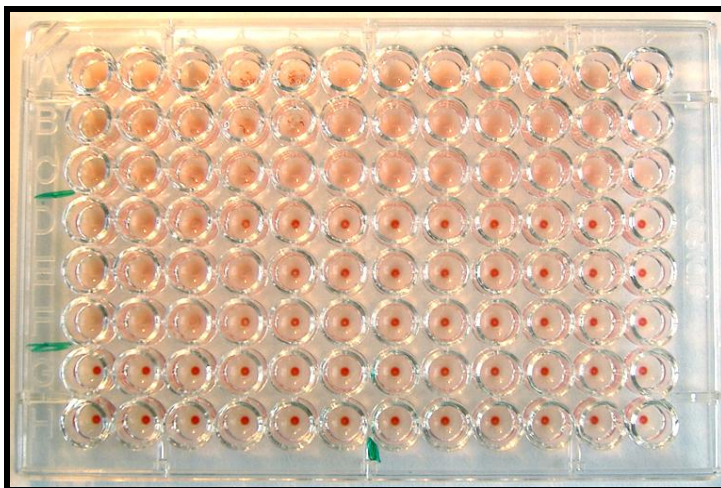


Figura 9.- Titulación del virus de la RHD por la técnica de hemoaglutinación

3.4.3.- Inoculación de los animales

El estudio se llevó a cabo sobre cuarenta y dos conejos. Tras un período de siete días de aclimatación todos los animales fueron inoculados por vía intramuscular con 2×10^4 unidades hemoaglutinantes de la cepa AST/89 del virus de la RHD en un volumen total de 300 μ l de SSF.

Los conejos fueron sacrificados a las 12, 24, 36, y 48 hpi con una inyección intravenosa de pentobarbital sódico. Como grupo control se emplearon 6 animales, que recibieron 300 μ l de SSF. De todos los animales se extrajo sangre y tejido hepático.

Los grupos experimentales utilizados en nuestro estudio fueron los siguientes:

- Grupo control
- Grupo de animales infectados sacrificados a las 12 hpi
- Grupo de animales infectados sacrificados a las 24 hpi
- Grupo de animales infectados sacrificados a las 36 hpi
- Grupo de animales infectados sacrificados a las 48 hpi

3.4.4.- Recogida de muestras

La extracción de sangre se realizó en la vena marginal de la oreja: en los animales control inmediatamente antes del sacrificio, y en los

animales infectados en el momento de la inoculación (tiempo 0) y a las 12, 24, 36 y 48 hpi.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos heparinizados, para determinar los parámetros bioquímicos. El plasma, resultante de la centrifugación durante 10 minutos a 2.500 xg a 4°C, se congeló a -80°C hasta la realización de los análisis. Se realizó la necropsia y se extrajo el hígado de todos los animales de forma programada inmediatamente tras la eutanasia. El hígado se pesó, troceó y lavó en SSF frío. Posteriormente, se congeló por inmersión en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta su utilización para los estudios de biología molecular.

3.5.- Métodos analíticos

3.5.1.- Determinaciones en plasma

3.5.1.1.- Actividad aspartato aminotransferasa (AST)

La actividad de la aspartato aminotransferasa (AST, ASAT, GOT, glutamato oxalacetato, EC 2.6.1.1) se determinó en plasma mediante una prueba comercial (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania).

La AST cataliza la reacción de α -cetoglutarato y ácido alanín sulfínico a piruvato y glutamato. En una segunda reacción, el piruvato se hidroliza bajo la acción de la piruvato oxidasa (POD) a acetilfosfato, anhídrido carbónico y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En presencia de POD, el H_2O_2 oxida la forma reducida e incolora del indicador a la forma azul.

La determinación se realizó mediante tiras reactivas específicas para la enzima, en las que se depositaron 32 μ l de la muestra. A través de una medición cinética a 567 nm en un autoanalizador (modelo Reflotrón), se obtuvo directamente la actividad enzimática de la AST en U/l.

3.5.1.2.- Actividad alanina aminotransferasa (ALT)

La actividad de la alanina aminotransferasa (ALT, ALAT, GPT, glutamato piruvato transaminasa, EC 2.6.1.2) se determinó en plasma mediante una prueba comercial (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania).

La ALT cataliza la reacción de α -cetoglutarato y alanina a piruvato y glutamato. En una segunda reacción, el piruvato se hidroliza bajo la acción de la POD a acetilfosfato, anhídrido carbónico y peróxido de hidrogeno (H_2O_2). En presencia de POD, se oxida la forma reducida e incolora del indicador a la forma azul.

La determinación se realizó mediante tiras reactivas específicas para la enzima, en las que se depositaron 32 μ l de la muestra. A través de una medición cinética a 567 nm en un autoanalizador (modelo Reflotrón), se obtuvo directamente la actividad enzimática de la ALT en U/l.

3.5.1.3.- Concentración de bilirrubina total

La concentración de BR total se determinó en plasma. Se usó en presencia de cafeína con el ácido sulfanílico diazotado para formar un colorante azoico.

Se utilizó una longitud de onda de 578 nm con una cubeta de un cm de paso de luz. La temperatura de incubación fue de 20-25°C. Se midió la extinción de la muestra frente al blanco.

3.5.2.- Determinaciones en sangre

3.5.2.1.- Concentración de glucosa

Para determinar la concentración de glucosa en sangre se utilizó un dispositivo digital comercial (Glucocard Memory, Menarini Diagnostics) mediante técnica electroquímica enzimática glucosa oxidasa y toma de muestra (2 µl) por capilaridad en tiras reactivas. Se obtuvo la concentración de glucosa en sangre en mg/dl.

3.5.3.- Determinaciones en hígado

3.5.3.1.- Obtención de homogeneizado total

Se homogeneizaron 0,2 g de hígado en 1 ml de tampón Tris/HCl (10 mM; pH 7,4) y un mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF, aprotinina e inhibidor de tripsina) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

El homogeneizado obtenido se pasó a un eppendorf y se centrifugó a 12.000 xg durante 30 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se alicuotó en tubos eppendorf y se almacenó hasta su uso a -80°C.

3.5.3.2.- Obtención de la fracción citosólica

Para la obtención de la fracción citosólica hepática, se procedió a la homogeneización de 1 g de hígado en 10 ml de tampón manitol, sacarosa, EDTA (pH 7,4) con una mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF, aprotinina e inhibidor de tripsina) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

El homogeneizado se centrifugó a 750 xg durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se centrifugó de nuevo durante 15 minutos a 12.000 xg y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 100.000 xg durante 1 hora. El sobrenadante final se almacenó a -80°C hasta su análisis.

3.5.3.3.- Obtención de la fracción nuclear

Para la obtención de la fracción nuclear hepática se procedió a la homogeneización de 100 µg de hígado en 1,5 ml de tampón HEPES NaOH (pH 7,9), MgCl₂, KCl y 0,1% de Nonidet con una mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF, aprotinina e inhibidor de tripsina) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Tras 30-60 minutos en hielo, se centrifugó a 1.000 xg durante 10 minutos a 4°C. Tras resuspender el pellet en 1,5 ml del mismo tampón sin

Nonidet, se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 1.000 xg. Finalmente, el pellet se resuspendió en 50 µl de tampón HEPES NaOH (pH 7,9), glicerol, MgCl₂, NaCl, EDTA (pH 8), y tras 30 minutos en hielo se centrifugó a 14.000 xg durante 30 minutos a 4°C para después recogerse el último sobrenadante, que se almacenó a -80°C hasta la realización de los análisis.

3.5.3.4.- Concentración de proteína

Se empleó una modificación del método de Lowry y cols. (1951) realizada por Markwell y cols. (1978) que se basa en la reducción de la proteína por el cobre en medio alcalino y la posterior reducción del ácido fosfomolibdico fosfotúngstico con la proteína tratada.

Los reactivos que se utilizaron para este método analítico fueron:

- Reactivo A: carbonato sódico (2%) hidróxido sódico (0,4%) tartrato sódico (0,16%) y dodecil sulfato sódico (1%)
- Reactivo B: sulfato de cobre (4%)
- Reactivo C: Folin Ciocalteu (50%)

La mezcla de incubación contenía en un volumen final de 2 ml los siguientes reactivos:

- Muestra
- Agua destilada
- Reactivo D (100 ml de A + 1 ml de B)

Tras incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos, se añadió a la mezcla anterior el reactivo C y, posteriormente, se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos en oscuridad. Transcurrido este tiempo se procedió a leer espectrofotométricamente la absorbancia a una longitud de onda de 650 nm.

Para calcular la concentración de proteína presente en las muestras se elaboró una recta patrón utilizando como solución madre albúmina bovina (fracción V, Sigma). El rango de medidas fue de 0,0625 a 1 mg de proteína por ml de agua destilada. La concentración de proteína se expresó en mg/ml.

3.5.3.5.- Western blot

La expresión de las proteínas Fas-L, IL-6, TNF- α , COX-2, VCAM-1, MAPKs (p38, ERK y JNK), p65, p50, Akt, STATs (STAT1, STAT3, STAT4, STAT5 y STAT6) y SOCS3 se determinó por western blot (Laemmli, 1970).

Reactivos:

- 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; KH_2PO_4 1,4 mM; NaHPO_4 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.

a) *Electroforesis en gel de poliacrilamida*

Se tomaron entre 25-100 μg de proteína a la que se le añadió solución de ebullición y se incubó durante 2 minutos a 100°C.

A continuación, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en tampón de electroforesis.

Para la realización del gel se preparó la siguiente mezcla:

- 3 ml de mezcla acrilamida/bisacrilamida (Sigma, Chemical Co. San Louis, USA).
- 4,75 ml del tampón Tris/HCl 0,75 M; pH 8,8.
- 0,5 ml de SDS al 2%.
- 0,43 ml de persulfato amónico al 1%.
- 0,3 ml de TEMED al 1%.
- 1 ml de H_2O milliQ.

b) *Transferencia*

Las proteínas ya separadas se deben transferir a una membrana de PVDF (Fluoruro de polivinilideno, Millipore, Bedford, MA, USA) para

permitir su exposición a los anticuerpos. Para realizar la transferencia, se utiliza un sistema semiseco a 13 V durante 20 minutos. Para comprobar que la transferencia había sido realizada con éxito se introdujo la membrana de PVDF en una solución de rojo Ponceau para visualizar las proteínas totales. La membrana se lavó en agitación con PBS. Posteriormente, se sometió a la solución de bloqueo durante 30 minutos a 37°C.

c) Incubación con anticuerpo primario

La membrana se incubó toda la noche con uno de los siguientes anticuerpos específicos:

- Anti IL-6 (Abcam Plc., Cambridge)
- Anti TNF- α (Abcam Plc., Cambridge)
- Anti Fas-L (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
- Anti COX-2 (Abcam Plc., Cambridge)
- Anti VCAM-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
- Anti p38 (Cell Signaling Technology, Inc.)
- Anti Fosfo-p38 (Cell Signaling Technology, Inc.)
- Anti ERK 1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
- Anti Fosfo-ERK 1/2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
- Anti JNK (Cell Signaling Technology, Inc.)
- Anti Fosfo-JNK (Cell Signaling Technology, Inc.)
- Anti Akt (Abcam Plc., Cambridge)
- Anti Fosfo-Akt 1/2/3 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
- Anti p65 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
- Anti p50 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

- Anti STAT1 (Cell Signaling Technology, Inc.)
- Anti Fosfo-STAT1 (Cell Signaling Technology, Inc.)
- Anti STAT3 (Cell Signaling Technology, Inc.)
- Anti Fosfo-STAT3 (Cell Signaling Technology, Inc.)
- Anti STAT4 (Cell Signaling Technology, Inc.)
- Anti Fosfo-STAT4 (Cell Signaling Technology, Inc.)
- Anti STAT5 (Cell Signaling Technology, Inc.)
- Anti Fosfo-STAT5 (Cell Signaling Technology, Inc.)
- Anti STAT6 (Cell Signaling Technology, Inc.)
- Anti Fosfo-STAT6 (Cell Signaling Technology, Inc.)
- Anti SOCS3 (Abcam Plc., Cambridge)
- Anti β -actina (Sigma, St Louis, MO, USA)

Transcurrido este periodo, se lavó cinco veces con PBS-Tween. Posteriormente, se incubó con un anticuerpo antiglobulina de conejo, ratón, cabra o cerdo (según el anticuerpo primario) unido a HRP (DAKO, Glostrup, Dinamarca). Finalmente, se volvió a lavar cinco veces con PBS-Tween.

d) Revelado

La detección de la proteína se realizó por quimioluminiscencia utilizando ECL (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) exponiendo la membrana durante 1 minuto a la mezcla reactiva comercial. Posteriormente, se introdujo en un cassette junto con una película (Amersham Hyperfilm ECL, UK) 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, Maryland, MA, USA).

3.5.3.6.- *Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)*

La determinación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, se realizó mediante la técnica EMSA (del inglés: “electrophoretic mobility shift assay”).

Los extractos nucleares fueron obtenidos según el método descrito anteriormente. Se examinaron la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 usando los oligonucleótidos específicos:

- NF- κ B: 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'
- AP-1: 5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3'

Las sondas fueron marcadas con polinucleótido quinasa T4. La reacción de unión incluía 10 μ g de proteína nuclear en buffer de incubación (50 mmol/l Tris-HCl (pH 7.5), 200 mmol/l NaCl, 5 mmol/l EDTA, 5 mmol/l mercaptoetanol, 20% glicerol y 1 μ g de poli(dI-dC)). Después de 15 minutos en hielo, se añadió el oligonucleótido marcado y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. La mezcla fue sometida a electroforesis a través de un gel de poliacrilamida al 6% durante 90 minutos a 150 V. El gel se secó en un desecador de geles y se sometió a auto-radiografía durante toda la noche a -80°C. La señal fue

analizada mediante densitometría utilizando un software comercial (Scion Image, Maryland, MA, USA).

3.5.4.- Tratamiento estadístico

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

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 realizaba 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+ vrs. 14.0 (Chicago, IL).

4.- RESULTADOS

Los organismos vivos están continuamente expuestos a situaciones estresantes en su entorno, tales como el estrés oxidativo y nitrosativo, la radiación ultravioleta o las infecciones. Las infecciones víricas activan señales intracelulares que pueden afectar a las funciones celulares. Asimismo, los virus dependen de estas alteraciones para conseguir infectar y replicarse en las células hospedadoras.

4.1.- Efecto del virus de la RHD sobre diversos parámetros plasmáticos indicadores de daño hepático

En los animales infectados con el virus de la RHD el daño hepático se puso de manifiesto por los incrementos significativos de las actividades de las transaminasas. Estas enzimas se localizan en los hepatocitos y, en condiciones fisiológicas, no se localizan extracelularmente. Sin embargo, cuando el hepatocito es dañado, la membrana plasmática puede romperse y las enzimas liberarse al medio extracelular y alcanzar niveles elevados en suero.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, indican que los conejos infectados con el virus de la RHD presentan un grave daño hepático en los períodos más avanzados de la infección como se pone de manifiesto por las alteraciones significativas que detectamos en diversos parámetros plasmáticos (Tabla 1).

Las actividades plasmáticas de la ALT y de la AST se incrementaron de forma marcada en los animales infectados a partir de las 36 hpi, alcanzando los valores más elevados entre las 36 y las 48 hpi,

apreciándose diferencias significativas respecto a los animales control (Tabla 1).

La concentración de la BR total en plasma se incrementó notablemente a partir de las 24 hpi en los animales infectados hasta alcanzar sus niveles máximos en los periodos más avanzados de la infección (Tabla 1).

La concentración de glucosa experimentó una disminución gradual a partir de las 24 hpi que fue significativa entre las 36 y 48 hpi en los animales infectados respecto al grupo control (Tabla 1).

	Control	12 hpi	24 hpi	36 hpi	48 hpi
ALT (U/l)	79 ± 8	73 ± 9	72 ± 14	687 ± 207*	1668 ± 149*
AST (U/l)	25 ± 4	23 ± 3	50 ± 20*	1010 ± 372*	3585 ± 1923*
Bilirubina (mg/dl)	0,46 ± 0,12	0,45 ± 0,34	0,98 ± 0,37*	1,29 ± 0,34*	2,03 ± 0,43*
Glucosa (mg/dl)	87 ± 13	96 ± 7	83 ± 6	78 ± 12	44 ± 11*

Tabla 1.- Efecto del virus de la RHD sobre diversos parámetros bioquímicos plasmáticos. Los datos representan valores medios ± E.E.M de 6-8 animales. * $p < 0,05$ respecto al grupo control.

4.2- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de las citocinas TNF- α e IL-6 y de Fas-L

Las citocinas juegan una importante función en la regulación de la respuesta inmunitaria y en la activación de diferentes vías de señalización intracelular en el FHF.

El ligando Fas (FasL o Apo-1) es una proteína de membrana tipo II miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) que está altamente expresado en linfocitos activados y que también juega un importante papel en los casos de fallo hepático agudo.

Para comprobar la presencia de TNF- α , IL-6 y Fas-L en los hígados de los animales infectados por el virus de la RHD se realizaron los correspondientes análisis por western blot a diferentes tiempos post-infección.

En la Figura 10, se muestra la evolución de la expresión del TNF- α en los animales infectados con el virus de la RHD. Se encontraron diferencias significativas desde las 12 hpi en todos los tiempos de estudio, registrándose el máximo valor a las 24 hpi (35 veces mayor que el del grupo control).

La expresión de la IL-6 aumentó de forma significativa tan sólo a las 24 hpi, manteniéndose en niveles basales en el resto de periodos de estudio (Figura 10).

En la Figura 11, se muestra la evolución de la expresión del Fas-L en los animales infectados. Se evidenció igualmente el incremento de esta proteína de membrana de forma significativa desde las 12 hpi (3 veces

superior al grupo control), manteniéndose elevada en todos los periodos de estudio.

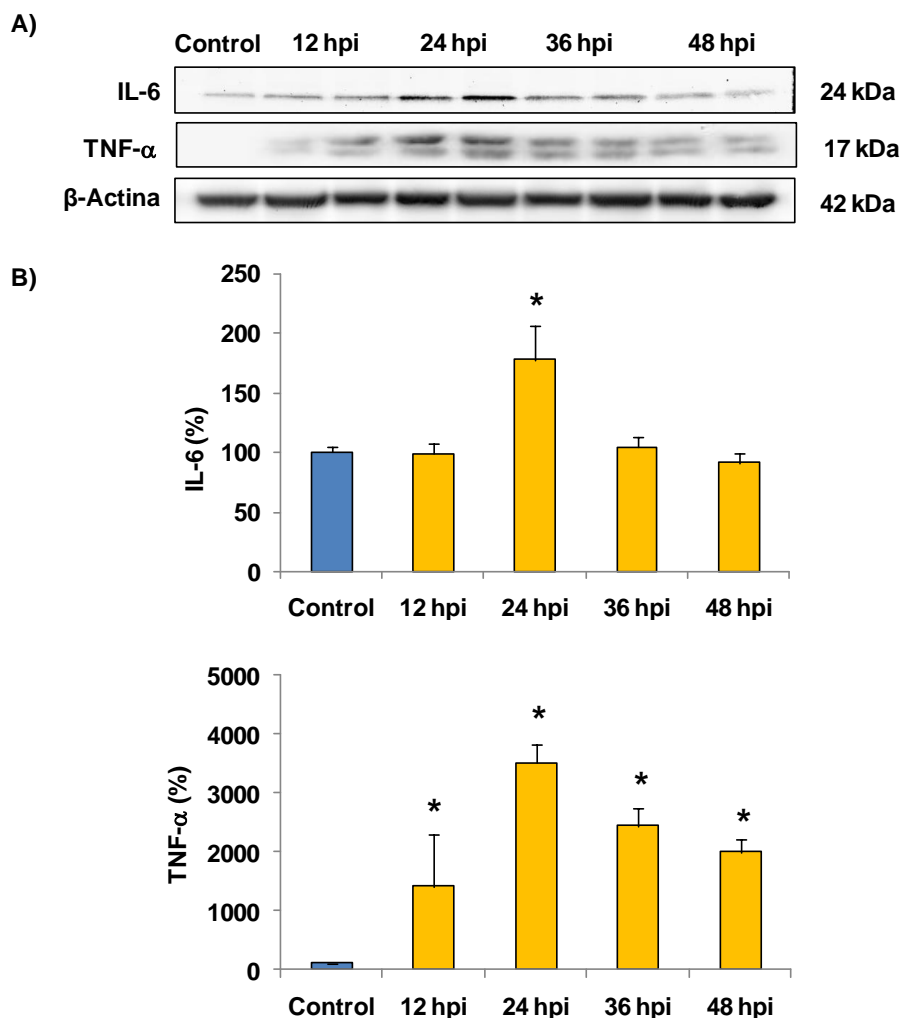


Figura 10.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática del TNF- α y la IL-6. A) Western blots representativos de los diferentes periodos de estudio. B) Análisis densitométrico. Los valores son medias \pm E.E.M. de 6-8 animales. * $p < 0,05$ respecto al grupo control.

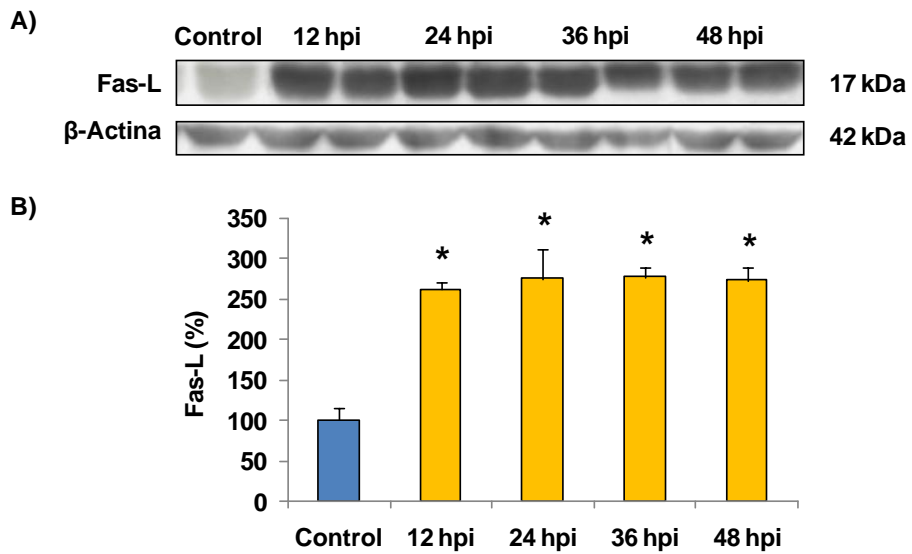


Figura 11.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática del Fas-L.
A) Western blots representativos de los diferentes periodos de estudio. B) Análisis densitométrico. Los valores son medias \pm E.E.M. de 6-8 animales. * $p < 0,05$ respecto al grupo control.

4.3.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de las MAPKs

Las familias de MAPKs están implicadas en procesos tales como la respuesta inflamatoria y la apoptosis. Estas vías de señalización parecen tener efectos opuestos sobre la regulación de la apoptosis; así se ha indicado que la JNK y la p38 son mediadoras de muerte celular, mientras que la ERK promueve la supervivencia.

El virus de la RHD induce la activación de las MAPKs en distintos periodos post-infección y con distinta intensidad. Para confirmar la presencia y activación de las proteínas: ERK, p38 y JNK, miembros de la familia de las MAPKs, en el hígado de los animales enfermos, se determinó la expresión de su forma fosforilada y total por western blot.

Como se puede observar en la Figura 12, la forma fosforilada de la p38 se activa a las 12 hpi, se mantiene activada hasta las 24 hpi, disminuye su activación a las 36 hpi y alcanza valores control a las 48 hpi

Así mismo, en la Figura 12 también se recoge la marcada activación de la forma fosforilada de JNK a las 12 hpi (2,1 veces superior a la del grupo control) y se mantiene con máxima activación desde las 24 hpi (3,7 veces) prácticamente hasta la muerte de los animales a las 48 hpi.

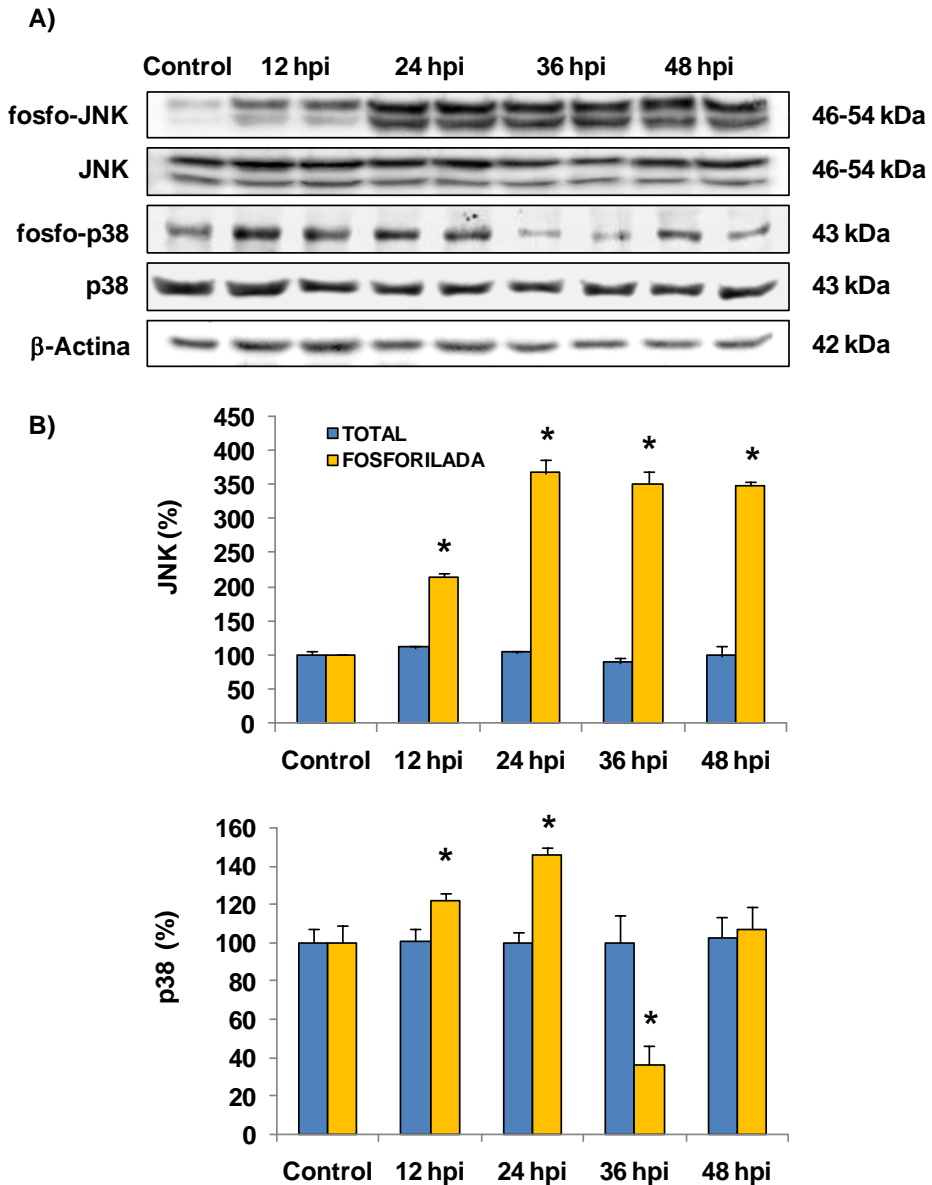


Figura 12.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de las MAPKs p38 y JNK. A) Western blots representativos de los diferentes periodos de estudio. B) Análisis densitométrico. Los valores son medias \pm E.E.M. de 6-8 animales. * $p < 0,05$ respecto al grupo control.

Aunque la ERK1/2 presenta una activación bifásica con un valor máximo a las 12 hpi (3,1 veces mayor que el del grupo control), y menor intensidad a las 36 hpi (2,8 veces superior al grupo control), su actividad termina por desaparecer por completo coincidiendo con la muerte de los animales a las 48 hpi (Figura 13).

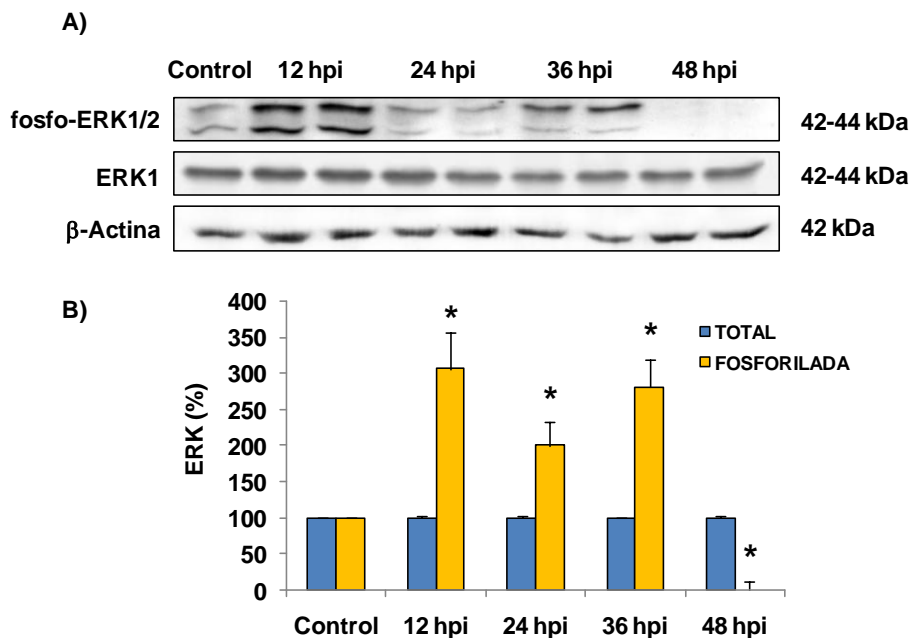


Figura 13.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de la MAPK ERK.
A) Western blots representativos de los diferentes periodos de estudio. B) Análisis densitométrico. Los valores son medias \pm E.E.M. de 6-8 animales. * $p < 0,05$ respecto al grupo control.

4.4.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de Akt

La ruta PI3K/Akt es activada en respuesta a varios factores de crecimiento y señales de supervivencia y fosforila y regula la actividad de varias cascadas de señalización. Akt es un efector clave de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y nudo esencial de esta cascada de señales que regula múltiples procesos celulares tales como el crecimiento, la transformación, la diferenciación y la supervivencia.

En general, las funciones principales de las proteínas Akt quinasas son favorecer la supervivencia, crecimiento y proliferación celular, mientras que algunas isoformas de Akt también juegan un papel clave en la angiogénesis y en el control del metabolismo celular.

En la Figura 14, se muestra un aumento significativo de la activación de Akt entre las 12 y 24 hpi. A las 12 hpi, se observa la máxima activación (19 veces superior a la del grupo control), descendiendo posteriormente hasta alcanzar niveles basales a las 48 hpi.

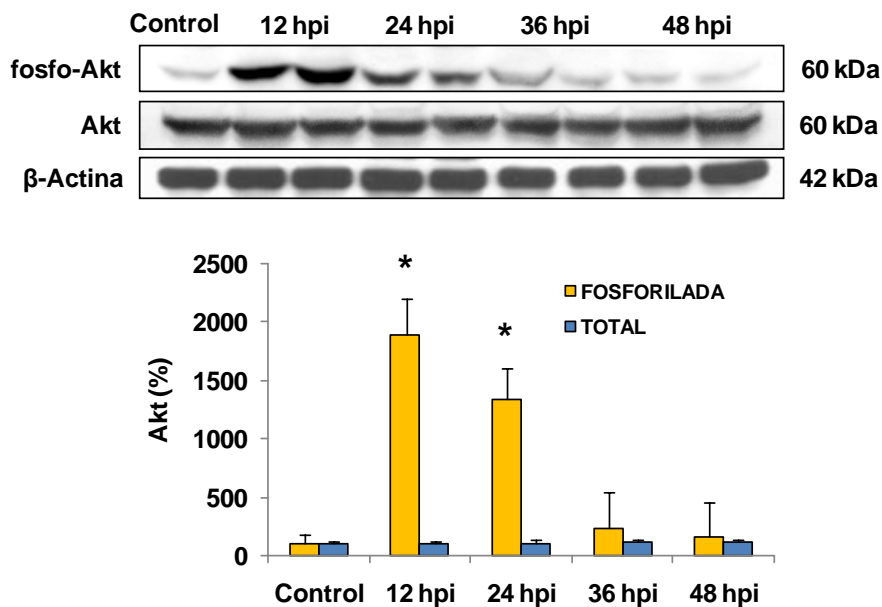


Figura 14.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de Akt.
A) Western blots representativos de los diferentes periodos de estudio. B) Análisis densitométrico. Los valores son medias \pm E.E.M. de 6-8 animales. * $p < 0,05$ respecto al grupo control.

4.5.- Efecto del virus de la RHD sobre la activación hepática de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B

Los factores de transcripción nuclear AP-1 y NF- κ B se han relacionado con mecanismos celulares, tanto fisiológicos como patológicos, de respuesta inflamatoria, apoptosis y estrés oxidativo, siendo en parte regulados por las vías de MAPKs.

El NF- κ B puede ser activado por múltiples bacterias y virus. Una vez activado, interviene en la regulación de genes que controlan la expresión de muchas citocinas inflamatorias, quimiocinas, receptores y moléculas de adhesión de la superficie celular.

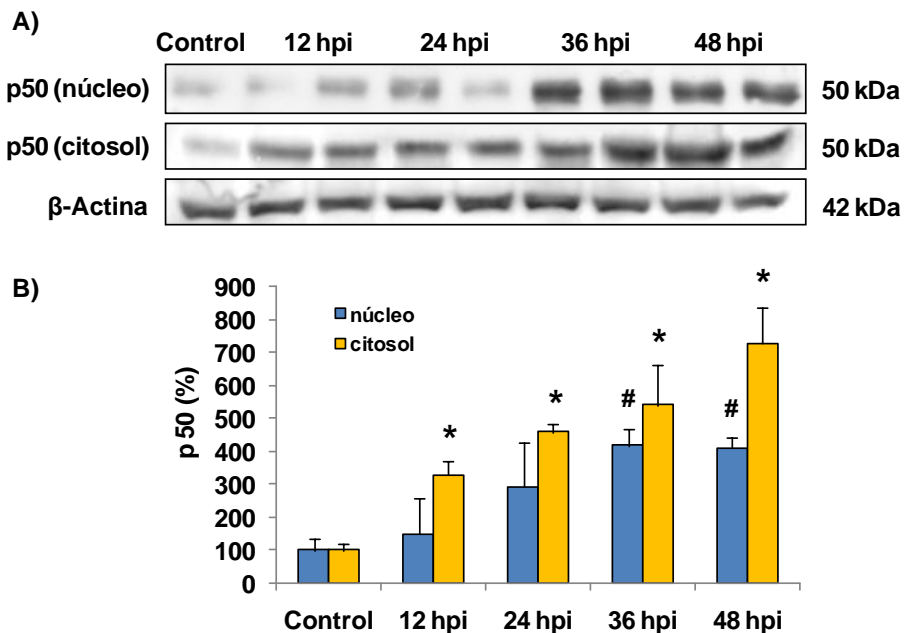


Figura 15.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de la subunidad p50. A) Western blots representativos de los diferentes periodos de estudio. B) Análisis densitométrico. Los valores son medias \pm E.E.M. de 6-8 animales. *,# $p < 0,05$ respecto al grupo control.

Para la determinación de la expresión de estos factores de transcripción, se realizaron western blots, citosólicos y nucleares, de las subunidades más relevantes del NF- κ B: p50 y p65. En extractos nucleares se realizó, además, un EMSA para determinar la unión del NF- κ B al ADN.

Como se observa en las Figuras 15 y 16, las subunidades p50 y p65 del NF- κ B muestran una evolución ascendente prácticamente desde las 12 hpi, tanto en la fracción citosólica como en la nuclear, alcanzando el máximo valor a las 48 hpi (7,3 veces superior en el caso de p50 y 113 veces superior en p65, frente al grupo control).

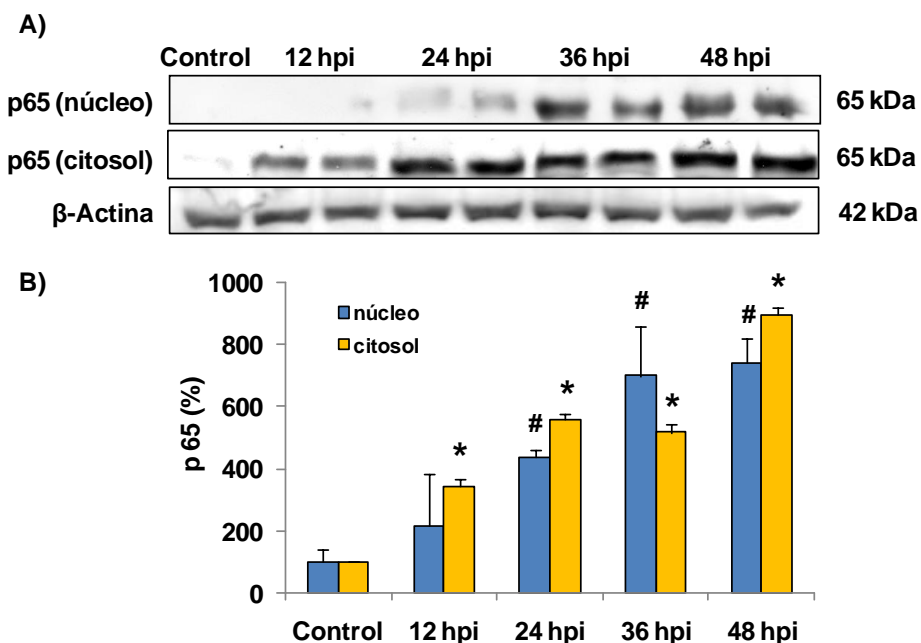


Figura 16.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de la subunidad p65.

A) Western blots representativos de los diferentes periodos de estudio. B) Análisis densitométrico. Los valores son medias \pm E.E.M. de 6-8 animales. *,# $p < 0,05$ respecto al grupo control.

En la Figura 17, se puede observar que la infección de los conejos por el virus de la RHD induce una marcada activación del NF- κ B, especialmente en los periodos finales de la infección (36-48 hpi) (2,5 veces frente al grupo control).

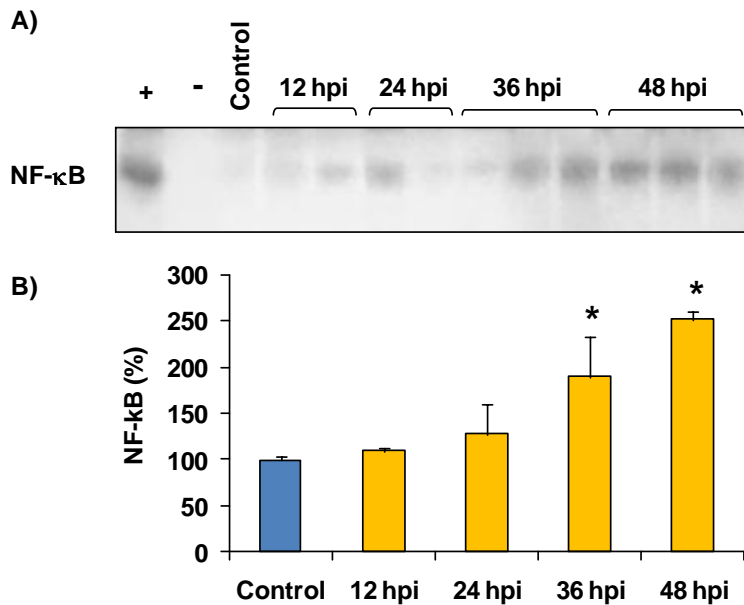


Figura 17.- Efecto del virus de la RHD sobre la activación hepática del factor NF- κ B. A) Western blots representativos de los diferentes periodos de estudio. B) Análisis densitométrico. Los valores son medias \pm E.E.M. de 6-8 animales. * $p < 0,05$ respecto al grupo control.

Por su parte, AP-1 es un factor de transcripción exclusivamente nuclear que se activa por fosforilación mediada por determinadas quinasas (JNK) que se translocan al núcleo e inducen en este factor una modificación postranslacional que le hace activo. Se realizó un EMSA para determinar la unión de ese factor al ADN. En la Figura 18, se muestra la evolución de AP-1 durante los diferentes periodos de estudio. Se

encontró un aumento significativo de expresión a partir de las 12 hpi, alcanzando la máxima translocación en el periodo final (36-48 hpi).

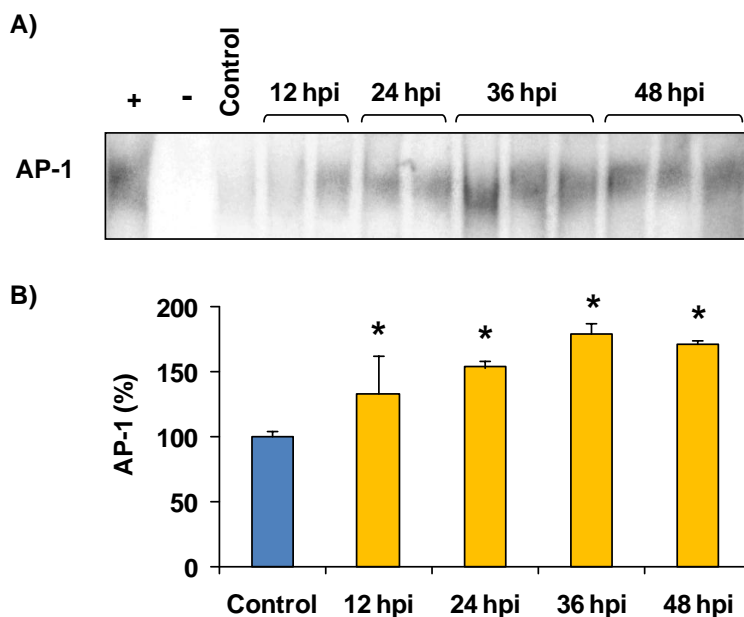


Figura 18.- Efecto del virus de la RHD sobre la activación hepática del factor AP-1. A) Western blots representativos de los diferentes periodos de estudio. B) Análisis densitométrico. Los valores son medias \pm E.E.M. de 6-8 animales. * $p < 0,05$ respecto al grupo control.

4.6- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de las proteínas proinflamatorias COX-2 y VCAM-1

En la respuesta inmunitaria, la VCAM-1 promueve la adhesión de linfocitos, monocitos, eosinófilos y células NK al endotelio vascular de los tejidos dañados, favoreciendo así los procesos inflamatorios.

La sobreexpresión de la VCAM-1 en células endoteliales es desencadenada por citocinas como el TNF- α y a su vez es regulada por factores de transcripción como el NF- κ B.

En la Figura 19 podemos observar el aumento de la expresión de VCAM-1 desde las 12 hpi, alcanzando el máximo valor entre las 24 y 48 hpi (4,5 veces mayor que la del grupo control).

La COX-2, cuya expresión es inducida por citocinas, factores de crecimiento, mitógenos, y otros mediadores como el factor de transcripción NF- κ B, juega un importante papel en la respuesta inflamatoria a través de la síntesis de prostaglandinas.

Se determinó la expresión de esta proteína en los diferentes periodos de estudio mediante western blot (Figura 19). Se encontraron diferencias significativas desde las 12 hpi, alcanzando un valor máximo a las 24 hpi (13,5 veces superior al del grupo control).

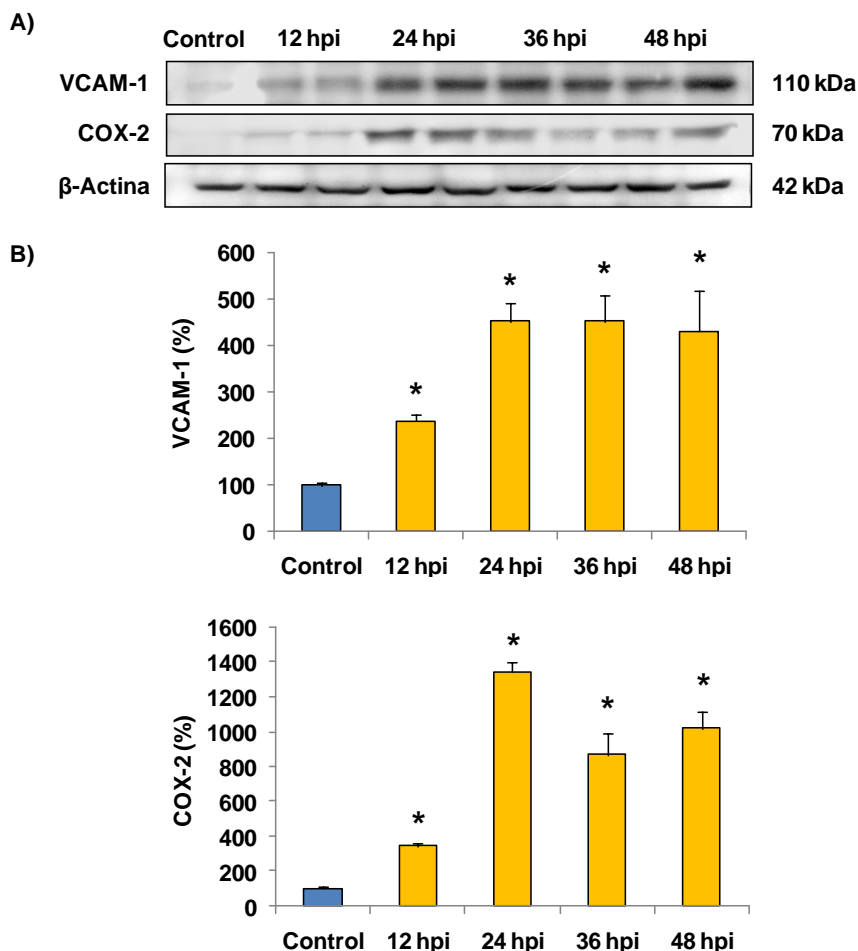


Figura 19.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de las proteínas proinflamatorias VCAM-1 y COX-2. A) Western blots representativos de los diferentes periodos de estudio. B) Análisis densitométrico. Los valores son medias \pm E.E.M. de 6-8 animales. * $p < 0,05$ respecto al grupo control.

4.7.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de los factores de activación STAT

Las proteínas STAT son activadas por multitud de estímulos de citocinas, hormonas o factores de crecimiento y juegan un importante papel en la respuesta antiviral y en la regeneración hepática.

La proteína STAT1 se relaciona con la respuesta antivírica, mientras que la proteína STAT3 está implicada en mecanismos de regeneración hepática y supervivencia celular.

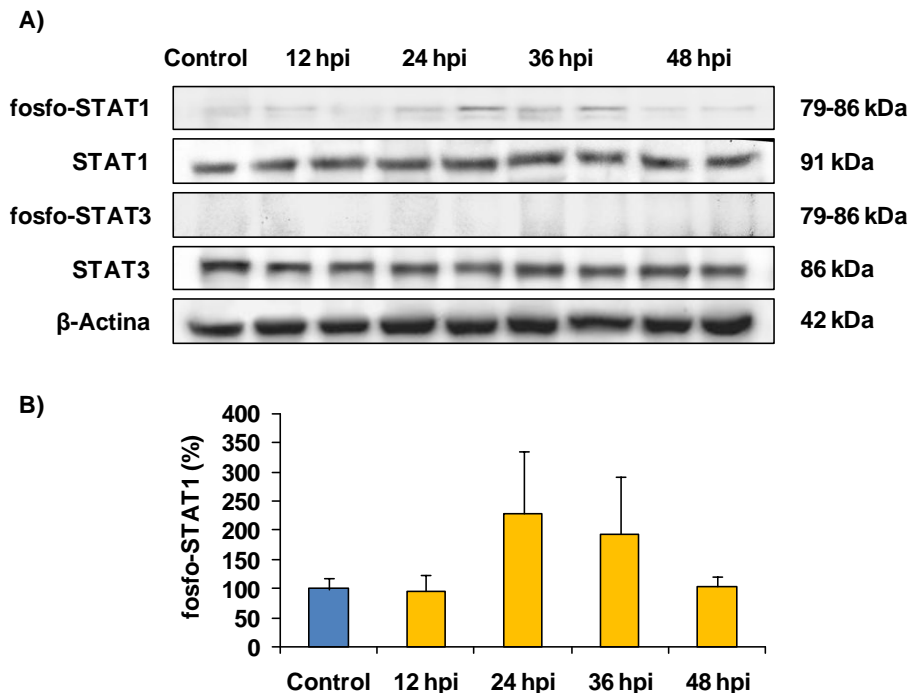


Figura 20.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de los factores de activación STAT. A) Western blots representativos de los diferentes periodos de estudio. B) Análisis densitométrico. Los valores son medias \pm E.E.M. de 6-8 animales.

En la Figura 20, se puede observar la activación transitoria de la STAT1 en algunos animales del estudio a las 24 y 36 hpi. Si bien, los cambios no son significativos, se observa una gran variabilidad individual en todos los tiempos de estudio. De hecho, la activación es muy significativa en algunos animales.

Simultáneamente se puede observar que la STAT3 apenas se activa en ningún tiempo del estudio. Si bien, es reseñable, la expresión de fosfo-STAT3 en un animal del estudio a las 24 hpi (no incluido en la imagen).

Por otra parte, con los anticuerpos empleados, no se detectó la presencia de expresión de las proteínas STAT4, STAT5 y STAT6 en el hígado ni de los animales enfermos ni de los controles.

4.8.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de las proteínas SOCS

Como ya se ha señalado con anterioridad, las citocinas regulan la respuesta celular interactuando con los receptores de la membrana plasmática de las células diana. De este modo, activan señales de transducción intracelular, tales como la vía de las JAK-STAT.

Los factores de transcripción STATs expresan, entre otros, los genes que transcriben para las proteínas SOCS. Estas proteínas actúan como pseudo-sustrato de las proteínas JAK inhibiendo su actividad quinasa y, por tanto, la activación de la vía JAK-STAT. En este sentido, actúan como un mecanismo de retroalimentación negativa de la señal inducida por citocinas.

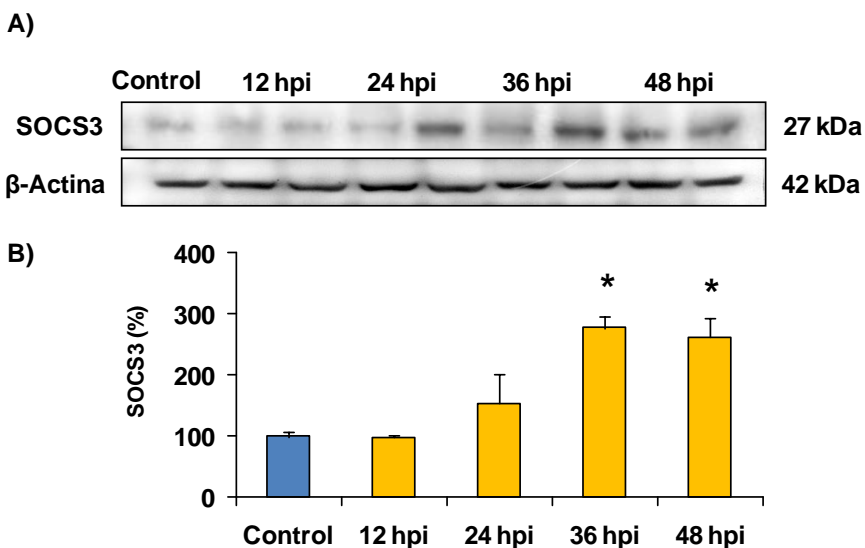


Figura 21.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de la proteína SOCS3. A) Western blots representativos de los diferentes periodos de estudio. B) Análisis densitométrico. Los valores son medias \pm E.E.M. de 6-8 animales. * $p < 0,05$ respecto al grupo control.

En la Figura 21 se puede observar un aumento de la expresión de SOCS3 a partir de las 24 hpi. Las diferencias fueron significativas frente al grupo control a las 36 y 48 hpi coincidiendo con la muerte de los animales

5.- DISCUSIÓN

El virus de la RHD es un miembro de la familia *Caliciviridae* que causa una enfermedad aguda mortal en conejos. La enfermedad se caracteriza por una hepatitis necrótica severa y una rápida evolución hacia la muerte de los animales entre 48 y 72 hpi en el 90% de los casos aproximadamente (Park y cols., 1995; Alonso y cols., 1998). El daño hepático juega un papel central en la patogenia y es histológicamente similar a las hepatitis virales causantes de FHF en humanos (Mikami, 1999). La infección experimental con el virus de la RHD es un modelo de FHF en el que la muerte celular por apoptosis es inducida tanto por vía intrínseca como extrínseca y juega un importante papel en la patogenia (San Miguel y cols., 2006). El FHF es un proceso grave inducido por virus, alcohol, drogas o fármacos hepatotóxicos, y que está marcada por una muerte masiva de los hepatocitos.

5.1.- Efecto del virus de la RHD sobre diversos parámetros plasmáticos indicadores de daño hepático

Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que el virus de la RHD produce importantes alteraciones en diversos marcadores de daño hepático tales como las transaminasas y la bilirrubina, entre otros.

Las actividades AST y ALT se han empleado clásicamente como indicadores del grado de daño hepático (Abboud y Kaplowitz, 2007). De hecho, unos niveles elevados de ALT en suero se relacionan con procesos inflamatorios en el hígado (Schmitz y cols., 2006). Diversos estudios indican que los niveles de ALT y AST se encuentran también

incrementados en pacientes afectados de FHF (Doria y cols., 2007; Eisenbach y cols., 2007; Korman y cols., 2008).

También detectamos en los conejos infectados un aumento significativo de la BR en los periodos avanzados de la infección al igual que se ha descrito en otros modelos animales (Kitazawa y cols., 2009) y en el hombre (Sharma y cols., 2008). Una inflamación aguda del hígado como la que se produce en las hepatitis, puede producir elevaciones importantes de la bilirrubina debido al fallo de la excreción hepática y en estos casos se acompaña de elevaciones importantes de aminotransferasas al igual que sucede en nuestro estudio.

La disminución en la concentración de glucosa que detectamos en los animales infectados y la alteración en su regulación podrían ser el resultado de un fallo tanto en la gluconeogénesis como en la depuración de la insulina en el hígado dañado (Sielaff y cols., 1995; Lee y Williams, 1996) al igual que sucede en el caso de FHF en el hombre (Han e Hyzy, 2006).

La hipoglucemia no es un resultado repetitivo en todos los modelos animales porque aunque se presenta en diferentes modelos de FHF en perro, cerdo y conejo (Blitzer y cols., 1978; Takada y cols., 2003), en otros modelos, la glucemia apenas se modifica. Esto parece ser una consecuencia de una gluconeogénesis compensadora del riñón y/o la inhibición de su captación por órganos periféricos (Eguchi y cols., 1996; Arai y cols., 2001).

5.2.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de las citocinas TNF- α e IL-6 y de Fas-L

El hígado es un órgano diana fundamental de las citocinas que son los principales mediadores responsables de la respuesta de fase aguda. La respuesta inflamatoria es la principal causa del inicio de los mecanismos de defensa del hospedador contra alteraciones de su homeostasis fisiológica y en ella juegan un importante papel diversas citocinas, moléculas de adhesión y otras proteínas proinflamatorias.

Mientras que los procesos dependientes de IL-6 están relacionados más bien con la regeneración hepática, otras citocinas proinflamatorias, como TNF- α , están involucradas en ciertos efectos tóxicos y proinflamatorios.

Además, múltiples factores proapoptóticos, incluyendo TNF- α y Fas-L, juegan un importante papel en el daño hepático agudo (Cheng y cols., 2009). En nuestro modelo de FHF hay una sobreexpresión de TNF- α y Fas-L desde las 12 hpi hasta la muerte de los animales. De este modo, la sobreexpresión de TNF- α puede contribuir de forma importante a la inducción de la apoptosis en la infección por el virus de la RHD.

En cambio, aunque la expresión de la IL-6 se incrementa a las 24 hpi, recupera valores normales a las 36-48 hpi, periodos en los que existe una marcada activación de la apoptosis.

La IL-6 es una citocina implicada en la regeneración hepática. Se ha demostrado que la mortalidad debida a una hepatectomía parcial en

ratones “knock out” para TNFR1 era revertida por la administración de la IL-6 y la consiguiente activación de STAT3 (Yamada y cols., 1997).

Nuestros resultados muestran que la infección por el virus de la RHD sólo origina un incremento transitorio de IL-6. Esto puede indicar que el virus de la RHD causa la activación de la vía de la MAPK ERK, lo que lleva a una inhibición de la IL-6. Así, el periodo de máxima activación de IL-6 coincidiría con el descenso de la expresión de la quinasa ERK a las 24 hpi.

El TNF- α es una citocina proinflamatoria que se incrementa en el suero de pacientes con FHF (Muto y cols., 1998). El TNF- α induce una apoptosis masiva de hepatocitos en otros modelos animales de FHF, como ratones con FHF inducido por Galactosamina/LPS (Gantner y cols., 1995; Nakama y cols., 2001; Qiu y cols., 2006). En el hígado de ratones y pacientes con FHF, las células hepáticas expresan grandes cantidades de TNF- α y de su receptor (TNFR), y se ha demostrado una relación directa entre el número de hepatocitos apoptóticos y el riesgo de muerte (Streetz y cols., 2000).

Se ha demostrado que el TNF- α está implicado en varios modelos de fallo hepático como mediador en paralelo de citotoxicidad y proliferación celular. El TNF- α también desencadena, a través de la vía de las caspasas, el proceso de apoptosis. Pero, por otro lado, activa al factor de transcripción NF- κ B que interviene en los procesos inflamatorios (Streetz y cols., 2001).

En otros modelos animales de hepatitis vírica aguda, la apoptosis de hepatocitos está mediada por receptores de muerte tales como Fas

(CD95), TNF- α y el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (Kuhnel y cols., 2000; Mundt y cols., 2003). A su vez, varios estudios realizados en el hombre muestran asimismo que la apoptosis de los hepatocitos está mediada a través de los receptores de muerte (Galle y cols., 1995; Strand y cols., 1998). En el hígado, el aumento de la expresión de Fas-L por los macrófagos hepáticos (células de Kupffer) se ha relacionado con el fallo hepático (Ryo y cols., 2000; Mita y cols., 2005; Peng y cols., 2006).

Se ha comprobado que la aplicación sistémica de silenciadores inducidos por RNA (siRNA) para la caspasa 8 inhibe su expresión en el hígado de conejos y es capaz de prevenir la apoptosis de hepatocitos mediada por Fas en el fallo hepático agudo inducido por un agente agonista específico de Fas (Zender y cols., 2003). En nuestro modelo, tiene lugar un incremento temprano y muy significativo de la expresión de Fas-L lo que de nuevo parece demostrar el papel fundamental que este mediador puede tener en la patogenia de los fallos agudos en el hombre.

Nuestros resultados indican que, en nuestro modelo de FHF de etiología vírica, se produce un marcado incremento en la expresión de TNF- α y de Fas-L junto con una falta de expresión de IL-6 que indica la importante respuesta de fase aguda y apoptosis junto con una falta de regeneración hepática. En el hígado, aunque la IL-6 estimula en los hepatocitos la producción de proteínas de fase aguda (SAA, CRP, complemento C3, fibrinógeno y macroglobulina) (Ramadori y Christ, 1999) tiene un importante papel en la regeneración hepática y en la protección contra el daño hepático (Sakamoto y cols., 1999; Zimmers y cols., 2003; Ikeda y cols., 2008; Tiberio y cols., 2008). De hecho, el

tratamiento con la IL-6 al inducir la activación de STAT3, protege contra la hepatitis fulminante originada por Fas mediante mecanismos dependientes e independientes de estado de óxido-reducción (Haga y cols., 2003).

5.3.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de las MAPKs

Las MAPKs son una familia de serina/treonina quinasas que incluye tres tipos predominantes en las células de los mamíferos: ERK, p38 y JNK, y que representan un grupo de proteínas relacionadas con la transducción de señales de gran variedad de estímulos celulares (Suzuki y cols., 1997).

En nuestro modelo se puede observar una doble activación de ERK1/2 con un pico de mayor entidad a las 12 hpi y otro menos marcado a las 36 hpi. Estos resultados obtenidos en los animales infectados con el virus de la RHD podrían ajustarse a una activación bifásica de la cascada de las ERK. La primera activación tendría lugar durante la llegada del virus al hígado, permitiendo la expresión de genes celulares y quizá también de genes virales; la segunda, se produciría una vez que hubiera empezado la replicación del genoma viral y la síntesis de proteínas tardías, regulando la expresión de genes y/o distintos procesos celulares que permitieran la morfogénesis de los viriones.

La ERK1/2 difiere de los otros dos principales miembros de las MAPKs en la ausencia de conexión con la inducción de respuestas proinflamatorias (Sabat y cols., 2001). De hecho, parece que juega un papel regulador de la proliferación, transformación y diferenciación

celular (Kolch, 2000). Varios estudios han demostrado su papel inductor de la supervivencia celular (Aoudjit y Vuori., 2001; Czaja y cols., 2003; Tommasini y cols., 2005). La activación de ERK1/2 en estudios *in vivo* indica que requiere la activación del receptor Met para una eficiente regeneración hepática, mientras que, en estudios *in vitro* sobre hepatocitos primarios las señales de Akt predominan sobre las de ERK1/2 (Schulze-Bergkamen y cols., 2004).

Se ha descrito la participación de la ERK en gran cantidad de modelos víricos diferentes, en los que el bloqueo de su actividad tiene distintas consecuencias. En los bornavirus, la inhibición de la ERK reduce la diseminación de viriones a las células adyacentes (Planz y cols., 2001). Sin embargo, parece que en la infección por el virus Maedi-Visna, el bloqueo de la proteína ERK afecta a su replicación (Barber y cols., 2002). Sin embargo, al inhibir la ERK durante la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) no se ve afectada su replicación pero sí la infectividad de los nuevos viriones, posiblemente debido a que la ERK cataliza la fosforilación de las proteínas víricas Rev, Tat y Nef, entre otras (Yang y Gabuzda, 1999).

Por otra parte, en muchos modelos víricos se ha observado una activación bifásica de la familia de las ERK al igual que en nuestros resultados: la primera durante la entrada de los virus y la segunda en etapas más tardías de la infección, normalmente cuando ha empezado la replicación de sus genomas o la síntesis de proteínas virales. El bloqueo de esta quinasa tiene como consecuencia la reducción de la síntesis de proteínas virales y/o de la replicación del virus.

Este tipo de activación bifásica de la proteína ERK que observamos induce el virus de la RHD coincide con el descrito para otros virus tales como el coxsackievirus B3 (Luo y cols., 2002), el virus de la gripe (Pleschka y cols., 2001), el virus respiratorio sincitial (Monick, y cols., 2001) y el vacciniavirus (de Magalhaes y cols., 2001; Andrade y cols., 2004), entre otros.

Por otra parte, en muchos tipos celulares mientras que la ERK1/2 inhibe los procesos apoptóticos, las MAPKs JNK y p38 contribuyen a la inducción de la apoptosis (Whitmarsh y Davis, 1996; Kurata, 2000) y la activación de JNK es bien sabido que desencadena la apoptosis en respuesta a estreses ambientales y citocinas proinflamatorias como TNF- α (Ip y Davis, 1998).

En los animales infectados con el virus de la RHD la expresión de p38 se incrementó en los periodos iniciales de la infección, normalizándose a las 48 hpi, mientras que, la expresión de JNK se incrementó de forma muy significativa durante todos los periodos postinfección del estudio.

La activación de la MAPK p38 además de estar relacionada con la inducción de la apoptosis, también parece tener consecuencias en la aparición de la respuesta inflamatoria que acompaña a algunas infecciones víricas a través de la inducción de la expresión de IL-6 (Beyaert y cols., 1996; Iordanov y cols., 2000).

Además, se ha descrito la activación de la vía de la MAPK p38 (Bode y cols., 1999; 2001) así como la cascada IKK/NF- κ B (Wurzer y

cols., 2004) en la infección por los virus influenza y se ha relacionado con el control de la expresión de la proteína SOCS3 (Pauli y cols., 2008).

En nuestro modelo animal se constata una fosforilación temprana y prolongada de JNK, que parece jugar un papel clave en la respuesta celular a la infección. En la apoptosis de los hepatocitos inducida por concanavalina A, una dieta deficiente en colina y metionina, o D-galactosamina/LPS se demostró asimismo que la JNK jugaba un papel fundamental (Schattenberg y cols., 2006).

La activación de JNK es necesaria para la activación de los efectores de muerte celular mediada por daño mitocondrial, incluidas las caspasa-9 y -3, y para modular algunas proteínas de la familia de Bcl-2 a múltiples niveles (Yu y cols., 2004; Takamura y cols., 2007). También se ha indicado que mientras que la activación transitoria de JNK desencadena la proliferación celular y es necesaria para la regeneración hepática (Schwabe y cols., 2003), la activación prolongada de JNK promueve la muerte celular (Maeda y cols., 2003). El virus de la RHD provoca una activación prolongada muy significativa en la expresión de JNK, lo que parece indicar que en nuestro modelo esta quinasa podría ser una de las principales dianas terapéuticas para evitar el fallo del hígado.

5.4.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de Akt

Esta vía de señalización es activada por multitud de factores de crecimiento y señales de supervivencia para desempeñar funciones

relacionadas con la supervivencia y la proliferación celular o la regulación del metabolismo.

En nuestro modelo se observa una marcada activación de la proteína Akt entre las 12 y las 24 hpi. Después, su expresión disminuye a niveles basales a las 48 hpi coincidiendo con la mayor activación de la apoptosis y la muerte de los animales. Estos resultados podrían reflejar cierto papel de la ruta de la PI3K/Akt en la entrada del virus en los hepatocitos y en la inducción de la supervivencia inhibiendo las señales de apoptosis en las primeras etapas de la infección. A su vez, puede intervenir en la activación del factor de transcripción NF- κ B y, por tanto, en la respuesta inflamatoria propia de estos periodos (Sánchez-Campos y cols., 2004).

Recientes hallazgos indican que las funciones de la proteína Akt son necesarias para el desarrollo de la respuesta antivírica dependiente del IFN complementando la función de los factores de transcripción STAT inducidos por el propio IFN (Kaur y cols., 2008). Pero también existe la posibilidad de que su función biológica sea divergente según el tipo de señal de activación. De esta forma, resulta de especial interés el hecho de que diversos virus activen y utilicen la vía PI3K/Akt para promover la supervivencia celular y la replicación vírica (Ehrhardt y cols., 2007; Sun y cols., 2008).

De hecho, algunos virus activan la ruta de señalización PI3K/Akt para permanecer en el hospedador de forma latente o crónica mediante la supresión de la apoptosis (por ejemplo, papilomavirus, herpesvirus humanos tipo 4 y 8, etc). Otros virus, en cambio, no activan esta vía para conseguir una supervivencia celular a largo plazo sino a corto plazo, en las

primeras etapas de la infección, durante la replicación vírica y la síntesis proteica. Este tipo de activación se ha demostrado en el virus respiratorio sincitial humano (Thomas y cols., 2002), en el virus de la rubeola (Cooray y cols., 2005) y en el coxsackievirus B3 (Zhang y cols., 2003). En estas infecciones víricas parece que la señal PI3K/Akt incrementa la supervivencia celular hasta que se completa el ciclo del virus. Tras esto, se inicia un proceso de apoptosis que facilita la difusión de los viriones (Roulston y cols., 1999).

También se ha descrito que esta vía es necesaria para una eficiente replicación de ciertos virus como el citomegalovirus (Johnson y cols., 2001), el coxsackievirus B3 (Esfandiarei y cols., 2004), el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (Francois y Klotman, 2003) o el virus influenza tipo A (Shin y cols., 2007). La inhibición de esta ruta de señalización reduce el título vírico, lo que sugiere que los fenómenos de fosforilación celular desencadenados por la vía del PI3K/Akt pueden ser necesarios para una eficiente replicación de algunos virus.

Por otra parte, se ha relacionado la activación de la vía PI3K/Akt con la entrada de algunos virus en las células hospedadoras por endocitosis. Como ejemplos se encuentran el adenovirus, el herpesvirus humano tipo 8 o el virus Ébola (Li y cols., 1998; Naranatt y cols., 2003; Saeed y cols., 2008).

5.5.- Efecto del virus de la RHD sobre la activación hepática de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B

En el presente estudio se observa la activación tanto del NF- κ B como de la AP-1 en el hígado de conejos infectados por el virus de la RHD. Tanto la activación del NF- κ B como de la AP-1 alcanza niveles máximos entre las 36 y 48 hpi, coincidiendo con los fenómenos apoptóticos y la muerte de los animales. Esta activación podría estar mediada tanto por estímulos proapoptóticos (JNK) como antiapoptóticos (Akt).

En principio, aunque los mecanismos de transducción de señales están generalmente interconectados en una complicada red (Arbabi y Maier, 2002), tanto la fosforilación de la p38 como la de la JNK ha sido relacionada con la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, en parte por vías convergentes (Ekstrand-Hammarström y cols., 2007). La activación de las MAPKs puede así contribuir al incremento de la translocación de ambos factores de transcripción al núcleo.

El NF- κ B es un factor de transcripción característico de la mayoría de infecciones virales (Arnulf y cols., 2002; Messmer y cols., 2002), en las que regula la expresión de muchos genes proinflamatorios o antivirales (Kopp y Medzhitov, 1999), y que ha sido relacionado a nivel transcripcional con la expresión de genes de moléculas de adhesión (Tung y cols., 2007; Zerfaoui y cols., 2008). También se ha descrito que la modulación de la ruta del NF- κ B podría facilitar la infección y replicación del virus Epstein-Barr, el virus herpes simplex tipo 1, y el virus influenza (Gao y cols., 2001; Nimmerjahn y cols., 2004; Taddeo y cols., 2004).

El NF- κ B tiene un importante papel en la regulación del sistema inmunitario, producción de citocinas inflamatorias, crecimiento celular e inflamación (Manna y Aggarwal, 2000). En ciertas situaciones actúa como una proteína antiapoptótica a través de la inducción de genes de supervivencia (Sonenshein, 1997). Por otra parte, los procesos de fibrosis hepática han sido relacionados con una inapropiada regulación del NF- κ B (Mann y Smart, 2002; Wang y Cheng, 2008).

El NF- κ B también regula la expresión de enzimas proinflamatorias entre las que se incluyen iNOS y COX-2 (van den Berg y cols., 2001; Ali y Mann, 2004; Buzzelli y cols., 2008).

La activación de JNK es esencial para la sobrerregulación de los genes dependientes de la AP-1 inducidos por virus en varios tipos celulares, y se sabe que las infecciones virales pueden inducir la actividad transcripcional de NF- κ B a través de la activación de JNK y p38 (Tung y cols., 2007).

La AP-1 regula la expresión de una gran variedad de genes, incluyendo los que participan en la respuesta inflamatoria (Chen y cols., 2006). Tiene como posible diana el gen de TNF- α , que contiene un sitio de unión para AP-1 en su promotor (Becker y cols., 1999).

Múltiples trabajos relacionan la activación de la MAPK JNK y la AP-1 con la apoptosis (Manna y Aggarwal, 2000; Taniguchi y cols., 2004; Lauricella y cols., 2006). En nuestro modelo animal de FHF parece asimismo que es fundamental en la patogenia la fosforilación significativa de JNK junto con la activación de los factores AP-1 y NF- κ B.

5.6.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de las proteínas proinflamatorias VCAM-1 y COX-2

La recuperación del hospedador de una infección viral depende en gran medida de una respuesta inflamatoria innata y adaptativa coordinada y fuertemente regulada en los órganos diana donde se produce la replicación vírica, así como una correcta reparación de los daños tisulares para limitar la extensión de la lesión.

En teoría, las lesiones tienen lugar a consecuencia directa de la capacidad de muchos virus de destruir sus dianas celulares, a la vez que resulta intensificado por células inflamatorias reclutadas por quimiocinas liberadas por las células infectadas (Dorner y Radbruch, 2007). Ahora bien, varios estudios indican un papel importante de los linfocitos T en el daño tisular, ya sea mediada por la propia inflamación o por la destrucción de las células infectadas (Thomsen y cols., 2003).

En nuestro estudio, tanto la molécula de adhesión VCAM-1 como la enzima COX-2, que contribuyen al daño hepático en el FHF (Whitmarsh y Davis, 1996; Han y cols., 2008), están sobreexpresadas en los conejos infectados con el virus de la RHD. Los efectos sobre estas proteínas podrían ser explicados, al menos parcialmente, por la activación del NF- κ B y la AP-1 en los mismos tiempos postinfección.

De hecho, la molécula de adhesión VCAM-1, entre otras, es expresada en la superficie de las células endoteliales como respuesta a la presencia de citocinas circulantes en infecciones virales a través de la activación del NF- κ B, favoreciendo la adhesión de macrófagos y

linfocitos T y su extravasación hacia el tejido diana donde se generará un foco inflamatorio (Wolf y cols, 2001; Ou y cols., 2008).

Existen resultados contradictorios relacionados con el papel de las MAPKs JNK y p38 en la regulación de la expresión de VCAM-1. Así mientras que, en células de condrosarcoma p38 actúa como inductora mientras que JNK actúa como inhibidora de la expresión de la VCAM-1 (Ju y cols., 2002), en fibroblastos humanos activados por TNF aumenta la expresión de la VCAM-1 al inhibirse ERK y JNK (Hosokawa y cols., 2006).

Por otra parte, si bien algunos resultados sugieren que la activación de la vía de la JNK por el TNF induce la expresión de ICAM-1 (De Cesaris y cols., 1999) otros, muestran que no hay efectos de las MAPKs sobre la activación de NF- κ B y la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, sugiriendo que su regulación en células endoteliales es sólo dependiente del NF- κ B (Zhou y cols., 2007). Estos resultados parecen inconsistentes y sugieren cierto papel de las MAPKs en la expresión de las moléculas de adhesión dependiendo de la naturaleza del estímulo o del tipo celular.

La COX-2 es una enzima inducida por gran variedad de factores entre los que se encuentran citocinas, factores de crecimiento y promotores tumorales y ha sido implicada en procesos inflamatorios y carcinogénesis. También ha sido implicada en la inhibición de la apoptosis y como promotora de la angiogénesis a través de la activación del NF- κ B (Crofford y cols., 1997) y modula la función inmunitaria e incrementa la invasividad tumoral (Xu, 2002; El-Bassiouny y cols., 2008).

Se ha demostrado que algunos virus producen la sobreexpresión de la COX-2 en los hepatocitos como un mecanismo potencial en el desarrollo de la fibrosis en infecciones crónicas por el virus de la hepatitis C (Leng y cols., 2003; Núñez y cols., 2004; Waris y cols, 2005); en nuestro estudio, la infección aguda inducida por el virus de la RHD se acompaña de una sobreexpresión de COX-2.

5.7.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de los factores de activación STAT

En el FHF la respuesta regenerativa es esencial para la completa recuperación funcional del hígado y para la supervivencia del paciente. La expresión de genes no conlleva replicación de ADN al menos que las células puedan continuar el ciclo celular. Esto depende del equilibrio entre los factores estimuladores, liberados como parte de la respuesta regenerativa, y las sustancias inhibitoras (Rutherford y Chung, 2008).

En el hígado, esta vía de señalización, es activada por más de veinte citocinas, factores de crecimiento, hormonas y proteínas de hepatitis virales.

Los miembros de la familia STAT han sido relacionados con la respuesta de fase aguda, con el daño hepático y con su regeneración, y juegan un importante papel en la defensa antiviral (Takaoka y Yanai, 2006).

En el hígado, la STAT1 es activada preferentemente por IFN α/β e IFN γ . Esta reconocido su papel esencial en la defensa antivírica,

inflamación, daño hepático y supresión de la regeneración hepática. Los interferones secretados se unen a su receptor en la superficie de las células activando la vía de señalización JAK/STAT, que estimula la transcripción de gran variedad de genes antivirales (Murray, 2007; Randall y Goodbourn, 2008).

De este modo, STAT1, cuando se fosforila, forma heterodímeros que pueden después traslocarse al núcleo para activar la transcripción de muchos genes diana, incluidas varias proteínas antivirales (Pestka, 2000).

Los datos arrojados por nuestra investigación indican que el virus de la RHD produce una activación transitoria de STAT1, mientras que STAT3 no se expresa en los hígados de la mayor parte de los conejos infectados; de hecho, tan solo mostró actividad en un conejo a las 24 hpi, un efecto que podría explicar en parte la falta de respuesta regenerativa detectada en esos animales (Sánchez-Campos y cols., 2004).

El mismo animal presentaba activada la STAT1 y la STAT3 a las 24 hpi, lo que podría sugerir en este caso concreto una correcta respuesta antivírica y regenerativa, que podría corresponderse con la supervivencia calculada en aproximadamente un 10% de los animales afectados. Los mecanismos que conducen al desarrollo de esta diferente respuesta en algún animal no son bien conocidos y merecen ser estudiados en profundidad para servir de base para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

El papel esencial de la STAT1 en la actividad antiviral y antitumoral del IFN- α/β ha sido bien demostrada en ratones deficientes en STAT1 (Meraz y cols., 1996), y se sabe que la STAT1 está activada en

varios modelos de FHF, incluida la hepatitis inducida por concanavalina A y por galactosamina/LPS (Hong y cols., 2002; Kim y cols., 2003).

Tras su activación, STAT1 y STAT2 forman heterodímeros u homodímeros que se translocan al núcleo para activar la transcripción de genes relacionados con proteínas antivirales, supresores tumorales o proteínas proapoptóticas (Gao, 2005). Se ha descrito que la vía IFN/STAT1 inhibe la expresión de iNOS y NF- κ B en células fibroblásticas, lo que redundaría en la supresión de la regeneración hepática (Ganster y cols., 2001). Del mismo modo, se sabe que cierta mutación genética en humanos, que provoca una deficiencia en STAT1, está asociada con una diseminación letal de infecciones virales (Dupuis y cols., 2003).

La STAT3 es activada principalmente en el hígado por la IL-6 y ha mostrado jugar un importante papel en la respuesta de fase aguda, en la protección contra el daño hepático y en promover la regeneración hepática (Gao, 2005). La mortalidad tras una hepatectomía parcial en ratones “knock out” para el TNFR1 es revertida por la administración de IL-6 y es asociada a la activación de la STAT3 (Yamada y cols., 1997).

Varios genes dependientes de STAT3 se han descrito como importantes factores que contribuyen al efecto hepatoprotector y mitogénico de la vía IL-6/STAT3 (Taub, 2003), y la activación de STAT3 ha sido implicada también en la actividad antivírica mediada por el IFN- α en una línea celular transfectada con un replicón del VHC (Zhu y cols., 2004).

Otro mecanismo que puede contribuir al papel hepatoprotector de la vía IL-6/STAT3 es la inhibición que produce sobre las células NK (Sun y cols., 2004).

Dado que la vía de señalización JAK/STAT juega un importante papel antiviral, puede ser objetivo de los virus para intentar evadir la respuesta inmunitaria del hospedador. De hecho, varios virus inhiben esta ruta de señalización. Por ejemplo, la proteína V del virus del simio tipo 5 degrada la STAT1 (Didcock y cols., 1999), mientras que el citomegalovirus humano tiene como objetivo la degradación de la JAK1 (Miller y cols., 1998). La infección por el virus varicella-zoster inhibe la expresión tanto de STAT1 como de JAK2 (Abendroth y cols., 2000). El VHC también inhibe la inmunidad del hospedador alterando la comunicación entre la vía de las MAPK y de las JAK/STAT (He y Katze, 2002). Otros virus, como el virus de las paperas, el virus del sarampión y el paramixovirus también bloquean la activación de STAT1 promoviendo la degradación de la proteína no fosforilada, y permitiendo que estos virus evadan la respuesta inflamatoria del hospedador (Horvath, 2004; Ulane y cols., 2003; Ramachandran y cols., 2008).

La activación de esta vía inducida por el IFN puede ser inhibida a diferentes niveles por varios virus a través de diversos mecanismos. Entre ellos se incluyen las proteínas SOCS y las PIAS.

5.8.- Efecto del virus de la RHD sobre la expresión hepática de las proteínas SOCS

El bloqueo de la función de las proteínas STAT se relaciona comúnmente con la evasión de la respuesta inmunitaria por los patógenos, y numerosos virus, incluido el VHC, paramixovirus o coronavirus, han desarrollado mecanismos para sortear las defensas del hospedador inhibiendo sus señales y alterando la comunicación entre la vía de las MAPKs y la de las STATs (Duechting y cols., 2008). Uno de estos mecanismos está relacionado con las proteínas SOCS.

La expresión de las proteínas SOCS puede ser inducida por estimulación de citocinas, regulando la señal no sólo como una retroalimentación negativa clásica, sino regulando a su vez toda la cascada de señalización mediante un proceso de regulación cruzada.

Aunque pueden intervenir otros factores, el hecho de que la SOCS3 se encuentre sobreexpresada en conejos infectados con el virus de la RHD muy probablemente contribuye a la inhibición de la expresión de STAT1/STAT3. De este modo, estrategias terapéuticas que bloqueen o modulen las SOCS pueden ser de interés para prevenir el daño hepático e incrementar la supervivencia en el FHF de origen vírico, siempre teniendo en cuenta que una falta de expresión continuada de estas proteínas podría dar lugar a procesos carcinogénicos.

Se ha demostrado que la falta de expresión de la SOCS3 en el hígado promueve procesos de hepatitis, carcinogénesis y supervivencia celular (Ogata y cols., 2006; Elliott, 2008).

En células deficientes en SOCS3 o en células donde la expresión de la SOCS3 es bloqueada por siRNA se reducen los títulos víricos (Pauli y cols., 2008). Además, se ha descrito que el nivel de inducción de la SOCS3 por el herpesvirus humano tipo 1 parece determinar si la infección evoluciona de forma aguda o persistente y que la sobreexpresión de la SOCS3 puede contribuir a la falta de respuesta a la terapia con IFN en pacientes con hepatitis C (Persico y cols., 2006).

La inducción de la transcripción de la SOCS3 por un virus se ha descrito además de para el herpesvirus tipo 1 y el VHC (Bode y cols., 2003; Yokota y cols., 2004), para virus respiratorios tales como el virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y el virus respiratorio sincitial (Okabayashi y cols., 2006; Zhao y cols., 2007).

Los efectos mediados por las SOCS están relacionados con el hecho de que estas moléculas son potentes inhibidores endógenos de la señal de las STATs. De este modo, se ha descrito que un incremento en la expresión de las proteínas SOCS está relacionado con la inhibición, inducida por la IL-10, de la activación hepática de STAT1 mediada por IFN- α , y que la sobreexpresión de SOCS1 y SOCS3 en células humanas de hepatoma HepG2 suprime la activación de STAT1/STAT3 inducida por IFN- α y la expresión génica de proteínas antivirales (Vlotides y cols., 2004).

6.- CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN PRIMERA:

El virus de la Enfermedad hemorrágica del conejo es un miembro de la familia Caliciviridae que causa una enfermedad aguda mortal en esta especie. El daño hepático juega un papel central en la patogenia y es histológicamente similar a las hepatitis virales causantes de fallo hepático fulminante en humanos. De hecho, los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que el virus de la RHD produce importantes alteraciones en diversos marcadores de daño hepático tales como las actividades de transaminasas y la concentración de bilirrubina en sangre, entre otros, que son coincidentes con las que se detectan en los casos agudos del hombre.

CONCLUSIÓN SEGUNDA:

En el modelo de fallo hepático fulminante de etiología vírica se produce desde los periodos más tempranos de la infección un marcado incremento en la expresión del factor de necrosis tumoral alfa y de la proteína de membrana ligando Fas, lo que pone de manifiesto su papel potencial en la estimulación de la apoptosis hepática, que tanta importancia parece tener en este modelo animal. Por otro lado, se detecta una falta de expresión de la interleucina 6, lo que parece indicar la ausencia de regeneración hepática en este modelo.

CONCLUSIÓN TERCERA:

El virus de la Enfermedad hemorrágica del conejo induce una activación bifásica de la expresión de la proteína quinasa activada por mitógenos ERK, con un pico de mayor entidad a las 12 horas postinfección y otro menos marcado a las 36 horas postinfección. La primera activación coincide con la presencia del virus en el parénquima hepático lo que podría permitir la expresión de genes celulares y probablemente genes virales, mientras que la segunda parece tener lugar una vez comenzada la replicación del genoma vírico y la síntesis de proteínas tardías. En cualquier caso, en el periodo final de la evolución del fallo del hígado, desaparece completamente la expresión de esta proteína quinasa lo que podría ser indicativo de la falta de regeneración hepática y contribuir a explicar la escasa supervivencia en este modelo animal.

CONCLUSIÓN CUARTA:

En los periodos más tempranos de la infección, el virus de la Enfermedad hemorrágica del conejo activa de forma significativa la expresión de las formas fosforiladas de JNK y p38, las principales familias de proteínas quinasas activadas por mitógenos involucradas en la muerte celular por apoptosis. En los periodos finales de la infección, tan solo se mantiene activada al máximo nivel la expresión de JNK. Toda vez que se ha indicado que la activación transitoria de JNK promueve la proliferación celular y es necesaria para la regeneración hepática pero que la activación prolongada promueve la muerte celular, en nuestro modelo animal esta

quinasa podría ser una de las principales dianas terapéuticas para evitar el fallo hepático agudo.

CONCLUSIÓN QUINTA:

El virus de la Enfermedad hemorrágica del conejo induce una marcada activación de la proteína Akt en los primeros periodos postinfección. Después, su expresión disminuye hasta niveles basales coincidiendo con la mayor activación de la apoptosis y la muerte de los animales. Estos resultados podrían reflejar cierto papel de la ruta de la PI3K/Akt en la entrada del virus en los hepatocitos y en la inducción de la supervivencia, inhibiendo las señales de apoptosis en las primeras etapas de la infección. A su vez, puede intervenir en la activación del factor de transcripción NF- κ B y, por tanto, en la respuesta inflamatoria propia de estos periodos.

CONCLUSIÓN SEXTA:

La infección experimental con el virus de la Enfermedad hemorrágica del conejo conduce a una sobreexpresión hepática temprana y sostenida de la molécula de adhesión celular vascular y de la ciclooxigenasa 2, moléculas que contribuyen al daño inflamatorio en el fallo hepático fulminante. Estos efectos sobre la expresión génica de ambas proteínas podrían ser explicados por la activación de los factores de transcripción nuclear NF- κ B y AP-1, responsables de su regulación y que

el virus induce de forma marcada desde los períodos más tempranos de su ciclo celular.

CONCLUSIÓN SÉPTIMA:

El virus de la Enfermedad hemorrágica del conejo provoca, desde los primeros periodos de la infección, una inhibición de la expresión de las proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción STAT1 y STAT3, implicadas en la respuesta antivírica y en la supervivencia celular, respectivamente. Aunque pudieran intervenir otros factores, el hecho de que la proteína supresora de la señal de citocinas SOCS3 se encuentre sobreexpresada en los conejos infectados en los mismos periodos postinfección puede ser, al menos en parte, la causa de tal inhibición. De este modo, las estrategias terapéuticas que bloqueen o modulen estas proteínas supresoras pueden ser de interés para prevenir el daño hepático e incrementar la supervivencia en el fallo hepático de causa vírica.

CONCLUSIÓN FINAL:

Los resultados obtenidos en este estudio han permitido profundizar en las vías de señalización que se encuentran involucradas en mayor medida en el desarrollo del fallo hepático fulminante producido por la infección con el virus de la Enfermedad hemorrágica del conejo y convierten a este modelo animal en una potente herramienta en la búsqueda y prueba de nuevas opciones terapéuticas en un síndrome para el que no existe terapia hasta el presente.

7.- BIBLIOGRAFÍA

- Abboud G y Kaplowitz N.** Drug-induced liver injury. *Drug Saf* 30: 277-294, 2007.
- Abendroth A, Slobedman B, Lee E, Mellins E, Wallace M y Arvin AM.** Modulation of major histocompatibility class II protein expression by varicella-zoster virus. *J Virol* 74: 1900-1907, 2000.
- Acharya SK, Panda SK, Saxena A y Gupta SD.** Acute hepatic failure in India: a perspective from the East. *J Gastroenterol Hepatol* 15: 473-479, 2000.
- Akira S.** Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells* 17: 138-146, 1999.
- Ali S y Mann DA.** Signal transduction via the NF-kappaB pathway: a targeted treatment modality for infection, inflammation and repair. *Cell Biochem Funct* 22: 67-79, 2004.
- Almasio PL, Hughes RD y Williams R.** Characterization of the molecular forms of fibronectin in fulminant hepatic failure. *Hepatology* 6: 1340-1345, 1986.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW y Yuan J.** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171, 1996.
- Alonso C, Oviedo JM, Martin-Alonso JM, Diaz E, Boga JA y Parra F.** Programmed cell death in the pathogenesis of rabbit hemorrhagic disease. *Arch Virol* 143: 321-332, 1998.
- Andrade AA, Silva PN, Pereira AC, De Sousa LP, Ferreira PC, Gazzinelli RT, Kroon EG, Ropert C y Bonjardim CA.** The vaccinia virus-stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is required for virus multiplication. *Biochem J* 381: 437-446, 2004.
- Andus T, Bauer J y Gerok W.** Effects of cytokines on the liver. *Hepatology* 13: 364-375, 1991.
- Antonsson B y Martinou JC.** The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 256: 50-57, 2000.
- Aoudjit F y Vuori K.** Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-flip and implications for anoikis. *J Cell Biol* 152: 633-643, 2001.
- Arai K, Lee K, Berthiaume F, Tompkins RG y Yarmush ML.** Intrahepatic amino acid and glucose metabolism in a D-galactosamine-induced rat liver failure model. *Hepatology* 34: 360-371, 2001.
- Arbabi S y Maier RV.** Mitogen-activated protein kinases. *Crit Care Med* 30: S74-S79, 2002.
- Argüello JL, Llanos A y Perez-Ordoyo LI.** Enfermedad vírica hemorrágica del conejo en España. *Med Vet* 5: 645-650, 1988.

Armendariz-Borunda J, Katai H, Jones CM, Seyer JM, Kang AH y Raghov R. Transforming growth factor beta gene expression is transiently enhanced at a critical stage during liver regeneration after CCl4 treatment. *Lab Invest* 69: 283-294, 1993.

Arnulf B, Villemain A, Nicot C, Mordelet E, Charneau P, Kersual J, Zermati Y, Mauviel A, Bazarbachi A y Hermine O. Human T-cell lymphotropic virus oncoprotein Tax represses TGF-beta 1 signaling in human T cells via c-Jun activation: a potential mechanism of HTLV-I leukemogenesis. *Blood* 100: 4129-4138, 2002.

Arvelo MB, Cooper JT, Longo C, Daniel S, Grey ST, Mahiou J, Czismadia E, Abu-Jawdeh G y Ferran C. A20 protects mice from D-galactosamine/lipopolysaccharide acute toxic lethal hepatitis. *Hepatology* 35: 535-543, 2002.

Assy N y Minuk GY. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. *J Hepatol* 26: 945-952, 1997.

Atillasoy E y Berk PD. Fulminant hepatic failure: pathophysiology, treatment, and survival. *Annu Rev Med* 46: 181-191, 1995.

Bao Q y Shi Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* 14: 56-65, 2007.

Barber SA, Bruett L, Douglass BR, Herbst DS, Zink MC y Clements JE. Visna virus-induced activation of MAPK is required for virus replication and correlates with virus-induced neuropathology. *J Virol* 76: 817-828, 2002.

Basile AS y Jones EA. Ammonia and GABA-ergic neurotransmission: interrelated factors in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Hepatology* 25: 1303-1305, 1997.

Becker C, Barbulescu K, Wirtz S, Meyer zum Buschenfelde KH, Pettersson S y Neurath MF. Constitutive and inducible in vivo protein-DNA interactions at the tumor necrosis factor-alpha promoter in primary human T lymphocytes. *Gene Expr* 8: 115-127, 1999.

Belghiti J, Sommacale D, Dondero F, Zinzindohoue F, Sauvanet A y Durand F. Auxiliary liver transplantation for acute liver failure. *HPB (Oxford)* 6: 83-87, 2004.

Berasain C, Garcia-Trevijano ER, Castillo J, Erroba E, Santamaria M, Lee DC, Prieto J y Avila MA. Novel role for amphiregulin in protection from liver injury. *J Biol Chem* 280: 19012-19020, 2005.

Bernal W. Changing patterns of causation and the use of transplantation in the United kingdom. *Semin Liver Dis* 23: 227-237, 2003.

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

Bernuau J y Durand F. Fulminating and subfulminating hepatic failure, emergency of prevention. *Gastroenterol Clin Biol* 21: 387-390, 1997.

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* 41: 152-155, 2004.

Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, Plaisance S, Lee JC, Haegeman G, Cohen P y Fiers W. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J* 15: 1914-1923, 1996.

Bélanger M y Butterworth RF. Acute liver failure: a critical appraisal of available animal models. *Metab Brain Dis* 20: 409-423, 2005.

Bihari DJ, Gimson AE y Williams R. Cardiovascular, pulmonary and renal complications of fulminant hepatic failure. *Semin Liver Dis* 6: 119-128, 1986.

Bilir BM, Guinette D, Karrer F, Kumpe DA, Krysl J, Stephens J, McGavran L, Ostrowska A y Durham J. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl* 6: 32-40, 2000.

Bjornsson E. Hepatotoxicity associated with antiepileptic drugs. *Acta Neurol Scand* 2008.

Blei AT. Cerebral edema and intracranial hypertension in acute liver failure: distinct aspects of the same problem. *Hepatology* 13: 376-379, 1991.

Blei AT. The pathophysiology of brain edema in acute liver failure. *Neurochem Int* 47: 71-77, 2005.

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

Blei AT, Omarg R y Butterworth RF. Animal Models of Hepatic Encephalopathies. En: *Animal Models of Neurological Disease* II, pp. 183-222, 1992.

Blitzer BL, Waggoner JG, Jones EA, Gralnick HR, Towne D, Butler J, Weise V, Kopin IJ, Walters I, Teychenne PF, Goodman DG y Berk PD. A model of fulminant hepatic failure in the rabbit. *Gastroenterology* 74: 664-671, 1978.

Bode JG, Gatsios P, Ludwig S, Rapp UR, Haussinger D, Heinrich PC y Graeve L. The mitogen-activated protein (MAP) kinase p38 and its upstream activator MAP kinase kinase 6 are involved in the activation of signal transducer and activator of transcription by hyperosmolarity. *J Biol Chem* 274: 30222-30227, 1999.

Bode JG, Ludwig S, Freitas CA, Schaper F, Ruhl M, Melmed S, Heinrich PC y Haussinger D. The MKK6/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is capable of inducing SOCS3 gene expression and inhibits IL-6-induced transcription. *Biol Chem* 382: 1447-1453, 2001.

Bode JG, Ludwig S, Ehrhardt C, Albrecht U, Erhardt A, Schaper F, Heinrich PC y Haussinger D. IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J* 17: 488-490, 2003.

Boelsterli UA, Zimmerman HJ y Kretz-Rommel A. Idiosyncratic liver toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs: molecular mechanisms and pathology. *Crit Rev Toxicol* 25: 207-235, 1995.

Burgering BM y Medema RH. Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *J Leukoc Biol* 73: 689-701, 2003.

Bustos M, Beraza N, Lasarte JJ, Baixeras E, Alzuguren P, Bordet T y Prieto J. Protection against liver damage by cardiotrophin-1: a hepatocyte survival factor up-regulated in the regenerating liver in rats. *Gastroenterology* 125: 192-201, 2003.

Buzzelli MD, Nagarajan M, Radtka JF, Shumate ML, Navaratnarajah M, Lang CH y Cooney RN. Nuclear factor kappaB mediates the inhibitory effects of tumor necrosis factor-alpha on growth hormone-inducible gene expression in liver. *Endocrinology* 149: 6378-6388, 2008.

Canbay A, Friedman S y Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* 39: 273-278, 2004.

Caraceni P y Van Thiel DH. Acute liver failure. *Lancet* 345: 163-169, 1995.

Carman JA, Garner MG, Catton MG, Thomas S, Westbury HA, Cannon RM, Collins BJ y Tribe IG. Viral haemorrhagic disease of rabbits and human health. *Epidemiol Infect* 121: 409-418, 1998.

Castro M y Krowka MJ. Hepatopulmonary syndrome. A pulmonary vascular complication of liver disease. *Clin Chest Med* 17: 35-48, 1996.

Chanda S y Mehendale HM. Nutritional modulation of the final outcome of hepatotoxic injury by energy substrates: an hypothesis for the mechanism. *Med Hypotheses* 46: 261-268, 1996.

Chen LW, Chang WJ, Wang JS y Hsu CM. Thermal injury-induced peroxynitrite production and pulmonary inducible nitric oxide synthase expression depend on JNK/AP-1 signaling. *Crit Care Med* 34: 142-150, 2006.

Cheng L, You Q, Yin H, Holt M, Franklin C y Ju C. Effect of polyI:C cotreatment on halothane-induced liver injury in mice. *Hepatology* 49: 215-226, 2009.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M y Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81: 505-512, 1995.

Clemmesen JO, Larsen FS, Kondrup J, Hansen BA y Ott P. Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* 29: 648-653, 1999.

Cooney RN. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock* 17: 83-90, 2002.

Cooray S, Jin L y Best JM. The involvement of survival signaling pathways in rubella-virus induced apoptosis. *Virology* 2: 1, 2005.

Cordoba J, Crespin J, Gottstein J y Blei AT. Mild hypothermia modifies ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Gastroenterology* 116: 686-693, 1999.

Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl* 49: 15-19, 1997.

Croker BA, Kiu H y Nicholson SE. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol* 19, 414-422, 2008.

Cui Y, Hosui A, Sun R, Shen K, Gavrilova O, Chen W, Cam MC, Gao B, Robinson GW y Hennighausen L. Loss of signal transducer and activator of transcription 5 leads to hepatosteatosis and impaired liver regeneration. *Hepatology* 46: 504-513, 2007.

Czaja MJ, Liu H y Wang Y. Oxidant-induced hepatocyte injury from menadione is regulated by ERK and AP-1 signaling. *Hepatology* 37: 1405-1413, 2003.

Danial NN y Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 116: 205-219, 2004.

De Cesaris P, Starace D, Starace G, Filippini A, Stefanini M y Ziparo E. Activation of Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway by tumor necrosis factor alpha leads to intercellular adhesion molecule-1 expression. *J Biol Chem* 274: 28978-28982, 1999.

de la Mata M., Meager A, Rolando N, Daniels HM, Nouri-Aria KT, Goka AK, Eddleston AL, Alexander GJ y Williams R. Tumour necrosis factor production in fulminant hepatic failure: relation to aetiology and superimposed microbial infection. *Clin Exp Immunol* 82: 479-484, 1990.

de Magalhaes JC, Andrade AA, Silva PN, Sousa LP, Ropert C, Ferreira PC, Kroon EG, Gazzinelli RT y Bonjardim CA. A mitogenic signal triggered at an early stage of vaccinia virus infection: implication of MEK/ERK and protein kinase A in virus multiplication. *J Biol Chem* 276: 38353-38360, 2001.

Dempsey RJ y Kindt GW. Experimental acute hepatic encephalopathy: relationship of pathological cerebral vasodilation to increased intracranial pressure. *Neurosurgery* 10: 737-741, 1982.

Didcock L, Young DF, Goodbourn S y Randall RE. The V protein of simian virus 5 inhibits interferon signalling by targeting STAT1 for proteasome-mediated degradation. *J Virol* 73: 9928-9933, 1999.

Doggrell SA. Suramin: potential in acute liver failure. *Expert Opin Investig Drugs* 13: 1361-1363, 2004.

Doria C, Nicotra G, D'Antona GM, Travali S, Messina A, Marino I y Gruttadauria G. Prognostic index of acute hepato-cellular damage. *Ann Ital Chir* 78: 169-176, 2007.

Dorner T y Radbruch A. Antibodies and B cell memory in viral immunity. *Immunity* 27: 384-392, 2007.

Duechting A, Tschöpe C, Kaiser H, Lamkemeyer T, Tanaka N, Aberle S, Lang F, Torresi J, Kandolf R y Bock CT. Human parvovirus B19 NS1 protein modulates inflammatory signaling by activation of STAT3/PIAS3 in human endothelial cells. *J Virol* 82: 7942-7952, 2008.

Duff JP, Chasey D, Munro R y Wooldridge M. European brown hare syndrome in England. *Vet Rec* 134: 669-673, 1994.

Dupuis S, Jouanguy E, Al Hajjar S, Fieschi C, Al Mohsen IZ, Al Jumaah S, Yang K, Chappier A, Eidenschenk C, Eid P, Al Ghonaium A, Tufenkeji H, Frayha H, Al Gazlan S, Al Rayes H, Schreiber RD, Gresser I y Casanova JL. Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet* 33: 388-391, 2003.

Earnshaw WC. Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 7: 337-343, 1995.

Eguchi S, Kamlot A, Ljubimova J, Hewitt WR, Lebow LT, Demetriou AA y Rozga J. Fulminant hepatic failure in rats: survival and effect on blood chemistry and liver regeneration. *Hepatology* 24: 1452-1459, 1996.

Ehrhardt C, Wolff T, Pleschka S, Planz O, Beermann W, Bode JG, Schmolke M y Ludwig S. Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. *J Virol* 81: 3058-3067, 2007.

Eichhorst ST. Modulation of apoptosis as a target for liver disease. *Expert Opin Ther Targets* 9: 83-99, 2005.

Eisenbach C, Sieg O, Stremmel W, Encke J y Merle U. Diagnostic criteria for acute liver failure due to Wilson disease. *World J Gastroenterol* 13: 1711-1714, 2007.

Ekstrand-Hammarstrom B, Osterlund C, Lilliehook B y Bucht A. Vitamin E down-modulates mitogen-activated protein kinases, nuclear factor-kappaB and inflammatory responses in lung epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 147: 359-369, 2007.

El Bassiouny AE, Zoheiry MM, Nosseir MM, El Ahwany EG, Ibrahim RA y El Bassiouni NE. Expression of cyclooxygenase-2 and transforming growth factor-beta1 in HCV-induced chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *MedGenMed* 9: 45, 2007.

El Bassiouny AE, El Bassiouni NE, Nosseir MM, Zoheiry MM, El Ahwany EG, Salah F, Omran ZS y Ibrahim RA. Circulating and hepatic Fas expression in HCV-induced chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Medscape J Med* 10: 130, 2008.

Elliott J. SOCS3 in liver regeneration and hepatocarcinoma. *Mol Interv* 8: 19-21, 2008.

Ellis A y Wendon J. Circulatory, respiratory, cerebral, and renal derangements in acute liver failure: pathophysiology and management. *Semin Liver Dis* 16: 379-388, 1996.

Escorsell A, Mas A y de la Mata M. Acute liver failure in Spain: analysis of 267 cases. *Liver Transpl* 13: 1389-1395, 2007.

Esfandiarei M, Luo H, Yanagawa B, Suarez A, Dabiri D, Zhang J y McManus BM. Protein kinase B/Akt regulates coxsackievirus B3 replication through a mechanism which is not caspase dependent. *J Virol* 78: 4289-4298, 2004.

Feranchak AP, Tyson RW, Narkewicz MR, Karrer FM y Sokol RJ. Fulminant Epstein-Barr viral hepatitis: orthotopic liver transplantation and review of the literature. *Liver Transpl Surg* 4: 469-476, 1998.

Fernandez MA, Albor C, Ingelmo-Torres M, Nixon SJ, Ferguson C, Kurzchalia T, Tebar F, Enrich C, Parton RG y Pol A. Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science* 313: 1628-1632, 2006.

Fischer R, Baumert T y Blum HE. Hepatitis C virus infection and apoptosis. *World J Gastroenterol* 13: 4865-4872, 2007.

Francois F y Klotman ME. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates human immunodeficiency virus type 1 replication following viral entry in primary CD4+ T lymphocytes and macrophages. *J Virol* 77: 2539-2549, 2003.

Frank PG y Lisanti MP. Caveolin-1 and liver regeneration: role in proliferation and lipogenesis. *Cell Cycle* 6: 115-116, 2007.

Fuchs A y Weissenbock H. Comparative histopathological study of rabbit haemorrhagic disease (RHD) and European brown hare syndrome (EBHS). *Journal of Comparative Pathology* 107: 103-113, 1992.

Fujioka S, Niu J, Schmidt C, Sclabas GM, Peng B, Uwagawa T, Li Z, Evans DB, Abbruzzese JL y Chiao PJ. NF-kappaB and AP-1 connection: mechanism of NF-kappaB-dependent regulation of AP-1 activity. *Mol Cell Biol* 24: 7806-7819, 2004.

Fukueda M, Ishizaki N, Hamada N, Kadono J, Kaieda M, Nakamura N, Komokata T y Sakata R. Porcine model of auxiliary partial orthotopic liver transplantation for acute liver failure. *Transplantation* 82: 1312-1318, 2006.

Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, Schaller H, Otto G, Stremmel W, Krammer PH y Runkel L. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* 182: 1223-1230, 1995.

Ganster RW, Taylor BS, Shao L y Geller DA. Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8638-8643, 2001.

Gantner F, Leist M, Jilg S, Germann PG, Freudenberg MA y Tiegs G. Tumor necrosis factor-induced hepatic DNA fragmentation as an early marker of T cell-dependent liver injury in mice. *Gastroenterology* 109: 166-176, 1995.

Gao B. Cytokines, STATs and liver disease. *Cell Mol Immunol* 2: 92-100, 2005.

Gao X, Ikuta K, Tajima M y Sairenji T. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induces Epstein-Barr virus reactivation via NF-kappaB and AP-1 as regulated by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *Virology* 286: 91-99, 2001.

Gecelter GR y Comer GM. Nutritional support during liver failure. *Crit Care Clin* 11: 675-683, 1995.

Gerlach JC, Zeilinger K y Patzer II JF. Bioartificial liver systems: why, what, whither? *Regen Med* 3: 575-595, 2008.

Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH y Los M. Apoptosis in liver diseases-detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit* 11: RA337-RA345, 2005.

Gong G, Waris G, Tanveer R y Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9599-9604, 2001.

Goto T, Takeuchi S, Miura K, Ohshima S, Mikami K, Yoneyama K, Sato M, Shibuya T, Watanabe D, Kataoka E, Segawa D, Endo A, Sato W, Yoshino R y Watanabe S. Suramin prevents fulminant hepatic failure resulting in reduction of lethality through the suppression of NF-kappaB activity. *Cytokine* 33: 28-35, 2006.

Grabhorn E, Richter A, Burdelski M, Rogiers X y Ganschow R. Neonatal hemochromatosis: long-term experience with favorable outcome. *Pediatrics* 118: 2060-2065, 2006.

Granzow H, Weiland F, Strebelow H-G, Liu CM y Schirrmeier H. Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV): ultrastructure and biochemical studies of typical and core-like particles present in liver homogenates. *Virus Research* 41: 163-172, 1996.

Green DR y Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312, 1998.

Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neill JD, Studdert MJ y Thiel HJ. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis* 181: S322-S330, 2000.

Guicciardi ME y Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut* 54: 1024-1033, 2005.

Haga S, Terui K, Zhang HQ, Enosawa S, Ogawa W, Inoue H, Okuyama T, Takeda K, Akira S, Ogino T, Irani K y Ozaki M. Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. *J Clin Invest* 112: 989-998, 2003.

Han MK y Hyzy R. Advances in critical care management of hepatic failure and insufficiency. *Crit Care Med* 34: 225-231, 2006.

Han C, Li G, Lim K, DeFrances MC, Gandhi CR y Wu T. Transgenic expression of cyclooxygenase-2 in hepatocytes accelerates endotoxin-induced acute liver failure. *J Immunol* 181: 8027-8035, 2008.

Harrison PM, Wendon JA, Gimson AE, Alexander GJ y Williams R. Improvement by acetylcysteine of hemodynamics and oxygen transport in fulminant hepatic failure. *N Engl J Med* 324: 1852-1857, 1991.

Hashemi M y Krocak TJ. Apoptosis and Autoimmune Disease. *Curr Med Chem-Anti-inflammatory & Anti-Allergy Agents* 4: 429-437, 2005.

Hashimoto K, Minagawa H y Yanagi Y. Caspase-dependent apoptosis in fulminant hepatic failure induced by herpes simplex virus in mice. *J Hepatol* 39: 773-778, 2003.

Hasselblatt P, Rath M, Komnenovic V, Zatloukal K y Wagner EF. Hepatocyte survival in acute hepatitis is due to c-Jun/AP-1-dependent expression of inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17105-17110, 2007.

Hayakawa T, Matsuzawa A, Noguchi T, Takeda K y Ichijo H. The ASK1-MAP kinase pathways in immune and stress responses. *Microbes Infect* 8: 1098-1107, 2006.

He Y y Katze MG. To interfere and to anti-interfere: the interplay between hepatitis C virus and interferon. *Viral Immunol* 15: 95-119, 2002.

Hong F, Jaruga B, Kim WH, Radaeva S, El Assal ON, Tian Z, Nguyen VA y Gao B. Opposing roles of STAT1 and STAT3 in T cell-mediated hepatitis: regulation by SOCS. *J Clin Invest* 110: 1503-1513, 2002.

Hoofnagle JH, Carithers RL, Jr., Shapiro C y Ascher N. Fulminant hepatic failure: summary of a workshop. *Hepatology* 21: 240-252, 1995.

Horvath CM. Weapons of STAT destruction. Interferon evasion by paramyxovirus V protein. *Eur J Biochem* 271: 4621-4628, 2004.

Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H y Matsuo T. Cytokines differentially regulate ICAM-1 and VCAM-1 expression on human gingival fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 144: 494-502, 2006.

Hosui A, Ohkawa K, Ishida H, Sato A, Nakanishi F, Ueda K, Takehara T, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M y Hayashi N. Hepatitis C virus core protein differently regulates the JAK-STAT signaling pathway under interleukin-6 and interferon-gamma stimuli. *J Biol Chem* 278: 28562-28571, 2003.

Hosui A y Hennighausen L. Genomic dissection of the cytokine-controlled STAT5 signaling network in liver. *Physiol Genomics* 34: 135-143, 2008.

Ikeda O, Ozaki M, Murata S, Matsuo R, Nakano Y, Watanabe M, Hisakura K, Myronovych A, Kawasaki T, Kohno K y Ohkohchi N. Autonomic regulation of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Surg Res* 152, 218-223, 2008.

Jordanov MS, Paranjape JM, Zhou A, Wong J, Williams BR, Meurs EF, Silverman RH y Magun BE. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase by double-stranded RNA and encephalomyocarditis virus: involvement of RNase L, protein kinase R, and alternative pathways. *Mol Cell Biol* 20: 617-627, 2000.

Ip YT y Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 10: 205-219, 1998.

Ito M, Nagata H, Miyakawa S y Fox IJ. Review of hepatocyte transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 16: 97-100, 2008.

Iwai H, Nagaki M, Naito T, Ishiki Y, Murakami N, Sugihara J, Muto Y y Moriwaki H. Removal of endotoxin and cytokines by plasma exchange in patients with acute hepatic failure. *Crit Care Med* 26: 873-876, 1998.

Jalan R y Hayes PC. Hepatic encephalopathy and ascites. *Lancet* 350: 1309-1315, 1997.

Jalan R. Acute liver failure: current management and future prospects. *J Hepatol* 42: 115-123, 2005.

Jameel NM, Thirunavukkarasu C, Wu T, Watkins SC, Friedman SL y Gandhi CR. p38-MAPK- and caspase-3-mediated superoxide-induced apoptosis of rat hepatic stellate cells: Reversal by retinoic acid. *J Cell Physiol* 218: 157-166, 2008.

Jaruga B, Hong F, Sun R, Radaeva S y Gao B. Crucial role of IL-4/STAT6 in T cell-mediated hepatitis: up-regulating eotaxins and IL-5 and recruiting leukocytes. *J Immunol* 171: 3233-3244, 2003.

Jayanthi V y Udayakumar N. Acute liver failure in pregnancy: an overview. *Minerva Gastroenterol Dietol* 54: 75-84, 2008.

Johnson RA, Wang X, Ma XL, Huong SM y Huang ES. Human cytomegalovirus up-regulates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) pathway: inhibition of PI3-K activity inhibits viral replication and virus-induced signaling. *J Virol* 75: 6022-6032, 2001.

Ju JW, Kim SJ, Jun CD y Chun JS. p38 kinase and c-Jun N-terminal kinase oppositely regulates tumor necrosis factor alpha-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression and cell adhesion in chondrosarcoma cells. *IUBMB Life* 54: 293-299, 2002.

Jung JY, Lee BJ, Tai JH, Park JH y Lee YS. Apoptosis in rabbit haemorrhagic disease. *J Comp Pathol* 123: 135-140, 2000.

Kaita KD, Assy N, Gauthier T, Zhang M, Meyers AF y Minuk GY. The beneficial effects of ciprofloxacin on survival and hepatic regenerative activity in a rat model of fulminant hepatic failure. *Hepatology* 27: 533-536, 1998.

Kanno S, Ishikawa M, Takayanagi M, Takayanagi Y y Sasaki K. Potentiation of acetaminophen hepatotoxicity by doxapram in mouse primary cultured hepatocytes. *Biol Pharm Bull* 23: 446-450, 2000.

Kaplowitz N. Mechanisms of liver cell injury. *J Hepatol* 32: 39-47, 2000.

Karakayali H, Ekici Y, Ozcay F, Bilezikci B, Arslan G y Haberal M. Pediatric liver transplantation for acute liver failure. *Transplant Proc* 39: 1157-1160, 2007.

Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270: 16483-16486, 1995.

Kasahara I, Saitoh K y Nakamura K. Apoptosis in acute hepatic failure: histopathological study of human liver tissue using the tunel method and immunohistochemistry. *J Med Dent Sci* 47: 167-175, 2000.

Kato A, Yoshidome H, Edwards MJ y Lentsch AB. Reduced hepatic ischemia/reperfusion injury by IL-4: potential anti-inflammatory role of STAT6. *Inflamm Res* 49: 275-279, 2000.

Kato A, Graul-Layman A, Edwards MJ y Lentsch AB. Promotion of hepatic ischemia/reperfusion injury by IL-12 is independent of STAT4. *Transplantation* 73: 1142-1145, 2002.

Kaur S, Sassano A, Dolniak B, Joshi S, Majchrzak-Kita B, Baker DP, Hay N, Fish EN y Platanias LC. Role of the Akt pathway in mRNA translation of interferon-stimulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 4808-4813, 2008.

Kerr JF. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 105: 13-20, 1971.

Kile BT y Alexander WS. The suppressors of cytokine signalling (SOCS). *Cell Mol Life Sci* 58: 1627-1635, 2001.

Kim KM, Kim YM, Park M, Park K, Chang HK, Park TK, Chung HH y Kang CY. A broad-spectrum caspase inhibitor blocks concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Clin Immunol* 97: 221-233, 2000.

Kim WH, Hong F, Radaeva S, Jaruga B, Fan S y Gao B. STAT1 plays an essential role in LPS/D-galactosamine-induced liver apoptosis and injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285: G761-G768, 2003.

Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J y Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285: 1-24, 2002.

Kitazawa T, Tsujimoto T, Kawaratani H y Fukui H. Therapeutic approach to regulate innate immune response by Toll-like receptor 4 antagonist E5564 in rats with D-galactosamine-induced acute severe liver injury. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009.

Kjaergard LL, Liu J, Als-Nielsen B y Gluud C. Artificial and bioartificial support systems for acute and acute-on-chronic liver failure: a systematic review. *JAMA* 289: 217-222, 2003.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR y Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275: 1132-1136, 1997.

Kobayashi M, Takeyoshi I, Yoshinari D, Matsumoto K y Morishita Y. P38 mitogen-activated protein kinase inhibition attenuates ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Surgery* 131: 344-349, 2002.

Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351: 289-305, 2000.

Kopp EB y Medzhitov R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 11: 13-18, 1999.

Korman JD, Volenberg I, Balko J, Webster J, Schiodt FV, Squires RH, Jr., Fontana RJ, Lee WM y Schilsky ML. Screening for Wilson disease in acute liver failure: a comparison of currently available diagnostic tests. *Hepatology* 48: 1167-1174, 2008.

Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 59: 1693-1700, 1999.

Krebs DL y Hilton DJ. SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci* 113: 2813-2819, 2000.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nunez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B y Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16: 3-11, 2009.

Kuhnel F, Zender L, Paul Y, Tietze MK, Trautwein C, Manns M y Kubicka S. NFkappaB mediates apoptosis through transcriptional activation of Fas (CD95) in adenoviral hepatitis. *J Biol Chem* 275: 6421-6427, 2000.

Kurata S. Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress. *J Biol Chem* 275: 23413-23416, 2000.

Kuwabara M, Asanuma T, Niwa K y Inanami O. Regulation of cell survival and death signals induced by oxidative stress. *J Clin Biochem Nutr* 43: 51-57, 2008.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.

Landshamer S, Hoehn M, Barth N, Duvezin-Caubet S, Schwake G, Tobaben S, Kazhdan I, Becattini B, Zahler S, Vollmar A, Pellicchia M, Reichert A, Plesnila N, Wagner E y Culmsee C. Bid-induced release of AIF from mitochondria causes immediate neuronal cell death. *Cell Death Differ* 15: 1553-1563, 2008.

Langnas AN, Markin RS, Cattral MS y Naides SJ. Parvovirus B19 as a possible causative agent of fulminant liver failure and associated aplastic anemia. *Hepatology* 22: 1661-1665, 1995.

Larsen FS, Olsen KS, Ejlersen E, Hansen BA, Paulson OB y Knudsen GM. Cerebral blood flow autoregulation and transcranial Doppler sonography in patients with cirrhosis. *Hepatology* 22: 730-736, 1995.

Larsen FS, Ejlersen E, Hansen BA, Knudsen GM, Tygstrup N y Secher NH. Functional loss of cerebral blood flow autoregulation in patients with fulminant hepatic failure. *J Hepatol* 23: 212-217, 1995.

Lartigue L, Medina C, Schembri L, Chabert P, Zanese M, Tomasello F, Dalibart R, Thoraval D, Crouzet M, Ichas F y De Giorgi F. An intracellular wave of cytochrome c propagates and precedes Bax redistribution during apoptosis. *J Cell Sci* 121: 3515-3523, 2008.

Lauricella M, Emanuele S, D'Anneo A, Calvaruso G, Vassallo B, Carlisi D, Portanova P, Vento R y Tesoriere G. JNK and AP-1 mediate apoptosis induced by bortezomib in HepG2 cells via FasL/caspase-8 and mitochondria-dependent pathways. *Apoptosis* 11: 607-625, 2006.

Lavazza A, Scieluna MT y Capucci L. Susceptibility of hares and rabbits to the European brown hare syndrome virus (EBHSV) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) under experimental conditions. *Zentralbl Veterinarmed B* 43: 401-410, 1996.

Lavrik I, Golks A y Krammer PH. Death receptor signaling. *J Cell Sci* 118: 265-267, 2005.

Lee WM. Acute liver failure. *N Engl J Med* 329: 1862-1872, 1993.

- Lee WM.** Management of acute liver failure. *Semin Liver Dis* 16: 369-378, 1996.
- Lee WM y Williams R.** *Acute Liver Failure*. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.
- Lee WM, Squires RH, Jr., Nyberg SL, Doo E y Hoofnagle JH.** Acute liver failure: Summary of a workshop. *Hepatology* 47: 1401-1415, 2008.
- Lee WM y Seremba E.** Etiologies of acute liver failure. *Curr Opin Crit Care* 14: 198-201, 2008.
- Leifeld L, Fink K, Debska G, Fielenbach M, Schmitz V, Sauerbruch T y Spengler U.** Anti-apoptotic function of gelsolin in fas antibody-induced liver failure in vivo. *Am J Pathol* 168: 778-785, 2006.
- Leng J, Han C, Demetris AJ, Michalopoulos GK y Wu T.** Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular carcinoma cell growth through Akt activation: evidence for Akt inhibition in celecoxib-induced apoptosis. *Hepatology* 38: 756-768, 2003.
- Li E, Stupack D, Klemke R, Cheresch DA y Nemerow GR.** Adenovirus endocytosis via alpha(v) integrins requires phosphoinositide-3-OH kinase. *J Virol* 72: 2055-2061, 1998.
- Liang TJ, Jeffers LJ, Reddy KR, De Medina M, Parker IT, Cheinquer H, Idrovo V, Rabassa A y Schiff ER.** Viral pathogenesis of hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 18: 1326-1333, 1993.
- Liu SJ, Xue HP, Pu BQ y Quia NH.** A new viral disease in rabbits. *Anim Husb Vet Med* 6: 253-255, 1984.
- Locksley RM, Killeen N y Lenardo MJ.** The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104: 487-501, 2001.
- Luo H, Yanagawa B, Zhang J, Luo Z, Zhang M, Esfandiarei M, Carthy C, Wilson JE, Yang D y McManus BM.** Cocksackievirus B3 replication is reduced by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. *J Virol* 76: 3365-3373, 2002.
- Ma X, Jia YT y Qiu DK.** Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates experimental autoimmune hepatitis: involvement of nuclear factor kappa B. *World J Gastroenterol* 13: 4249-4254, 2007.
- Machida K, Cheng KT, Lai CK, Jeng KS, Sung VM y Lai MM .** Hepatitis C virus triggers mitochondrial permeability transition with production of reactive oxygen species, leading to DNA damage and STAT3 activation. *J Virol* 80: 7199-7207, 2006.
- Maeda S, Chang L, Li ZW, Luo JL, Leffert H y Karin M.** IKKbeta is required for prevention of apoptosis mediated by cell-bound but not by circulating TNFalpha. *Immunity* 19: 725-737, 2003.

Malhi H, Gores GJ y Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 43: S31-S44, 2006.

Malhi H y Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology* 134: 1641-1654, 2008.

Mann DA y Smart DE. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. *Gut* 50: 891-896, 2002.

Mann FC. Studies in the physiology of the liver: I. Technique and general effects of removal. *Am J Med Sci* 161: 37-42, 1921.

Manna SK y Aggarwal BB. Vesnarinone suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun kinase, and apoptosis. *J Immunol* 164: 5815-5825, 2000.

Manning BD y Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129: 1261-1274, 2007.

Marcato PS, Benazzi C, Vecchi C, Salda LD, Simoni P, Aiello P y Tumino G. L'epatite necrotica infettiva del coniglio. Profilo patogenico di una nova malattia hemorrhagica. *Rivista Di Coniglicoltura* 9: 59-64, 1988.

Marcato PS, Benazzi C, Vecchi G, Galeotti M, Della SL, Sarli G y Lucidi P. Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev Sci Tech* 10: 371-392, 1991.

Marques JM, Belza I, Holtmann B, Pennica D, Prieto J y Bustos M. Cardiotrophin-1 is an essential factor in the natural defense of the liver against apoptosis. *Hepatology* 45: 639-648, 2007.

Mas A y Rodes J. Fulminant hepatic failure. *Lancet* 349: 1081-1085, 1997.

Master S, Gottstein J y Blei AT. Cerebral blood flow and the development of ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology* 30: 876-880, 1999.

Matsumoto A, Masuhara M, Mitsui K, Yokouchi M, Ohtsubo M, Misawa H, Miyajima A y Yoshimura A. CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood* 89: 3148-3154, 1997.

Mayoral R, Fernandez-Martinez A, Roy R, Bosca L y Martin-Sanz P. Dispensability and dynamics of caveolin-1 during liver regeneration and in isolated hepatic cells. *Hepatology* 46: 813-822, 2007.

McCarthy M y Wilkinson ML. Recent advances: hepatology. *BMJ* 318: 1256-1259, 1999.

McCormick AL. Control of apoptosis by human cytomegalovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 325: 281-295, 2008.

McGregor AH, More LJ, Simpson KJ y Harrison DJ. Liver death and regeneration in paracetamol toxicity. *Hum Exp Toxicol* 22: 221-227, 2003.

Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, Kaplan DH, Riley JK, Greenlund AC, Campbell D, Carver-Moore K, DuBois RN, Clark R, Aguet M y Schreiber RD. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84: 431-442, 1996.

Messmer D, Bromberg J, Devgan G, Jacque JM, Granelli-Piperno A y Pope M. Human immunodeficiency virus type 1 Nef mediates activation of STAT3 in immature dendritic cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18: 1043-1050, 2002.

Metselaar HJ, Hesselink EJ, de Rave S, ten Kate FJ, Lameris JS, Groenland TH, Reuvers CB, Weimar W, Terpstra OT y Schalm SW. Recovery of failing liver after auxiliary heterotopic transplantation. *Lancet* 335: 1156-1157, 1990.

Mikami O, Park JH, Kimura T, Ochiai K y Itakura C. Hepatic lesions in young rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus. *Res Vet Sci* 66: 237-242, 1999.

Miller DM, Rahill BM, Boss JM, Lairmore MD, Durbin JE, Waldman JW y Sedmak DD. Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway. *J Exp Med* 187: 675-683, 1998.

Mita A, Hashikura Y, Tagawa Y, Nakayama J, Kawakubo M y Miyagawa S. Expression of Fas ligand by hepatic macrophages in patients with fulminant hepatic failure. *Am J Gastroenterol* 100: 2551-2559, 2005.

Mizock BA y Falk JL. Lactic acidosis in critical illness. *Crit Care Med* 20: 80-93, 1992.

Monick M, Staber J, Thomas K y Hunninghake G. Respiratory syncytial virus infection results in activation of multiple protein kinase C isoforms leading to activation of mitogen-activated protein kinase. *J Immunol* 166: 2681-2687, 2001.

Moumen A, Ieraci A, Patane S, Sole C, Comella JX, Dono R y Maina F. Met signals hepatocyte survival by preventing Fas-triggered FLIP degradation in a PI3k-Akt-dependent manner. *Hepatology* 45: 1210-1217, 2007.

Mundt B, Kuhnel F, Zender L, Paul Y, Tillmann H, Trautwein C, Manns MP y Kubicka S. Involvement of TRAIL and its receptors in viral hepatitis. *FASEB J* 17: 94-96, 2003.

Murray PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* 178: 2623-2629, 2007.

Muto Y, Nouri-Aria KT, Meager A, Alexander GJ, Eddleston AL y Williams R. Enhanced tumour necrosis factor and interleukin-1 in fulminant hepatic failure. *Lancet* 2: 72-74, 1988.

Nakama T, Hirono S, Moriuchi A, Hasuike S, Nagata K, Hori T, Ido A, Hayashi K y Tsubouchi H. Etoposide prevents apoptosis in mouse liver with D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure resulting in reduction of lethality. *Hepatology* 33: 1441-1450, 2001.

Naranatt PP, Akula SM, Zien CA, Krishnan HH y Chandran B. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces the phosphatidylinositol 3-kinase-PKC-zeta-MEK-ERK signaling pathway in target cells early during infection: implications for infectivity. *J Virol* 77: 1524-1539, 2003.

Navasa M, Garcia-Pagan JC, Bosch J, Riera JR, Banares R, Mas A, Bruguera M y Rodes J. Portal hypertension in acute liver failure. *Gut* 33: 965-968, 1992.

Newsome P, Nelson L, Ansell I, Ross J, Hayes PC y Plevris JN. The inhibition of growth due to fulminant hepatic failure serum is not due to increased apoptosis/necrosis. *Journal of Hepatology* 32: 59, 2000.

Nimmerjahn F, Dudziak D, Dirmeier U, Hobom G, Riedel A, Schlee M, Staudt LM, Rosenwald A, Behrends U, Bornkamm GW y Mautner J. Active NF-kappaB signalling is a prerequisite for influenza virus infection. *J Gen Virol* 85: 2347-2356, 2004.

Norenberg MD, Jayakumar AR, Rama Rao KV y Panickar KS. New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab Brain Dis* 22: 219-234, 2007.

Nourjah P, Ahmad SR, Karwoski C y Willy M. Estimates of acetaminophen (Paracetamol)-associated overdoses in the United States. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 15: 398-405, 2006.

Núñez O, Fernandez-Martinez A, Majano PL, Apolinario A, Gomez-Gonzalo M, Benedicto I, Lopez-Cabrera M, Bosca L, Clemente G, Garcia-Monzon C y Martin-Sanz P. Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. *Gut* 53: 1665-1672, 2004.

Nussler A, Konig S, Ott M, Sokal E, Christ B, Thasler W, Brulport M, Gabelein G, Schormann W, Schulze M, Ellis E, Kraemer M, Nocken F, Fleig W, Manns M, Strom SC y Hengstler JG. Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases. *Journal of Hepatology* 45: 144-159, 2006.

O'Grady J. Modern management of acute liver failure. *Clin Liver Dis* 11: 291-303, 2007.

O'Grady JG y Williams R. Acute liver failure. *Baillieres Clin Gastroenterol* 3: 75-89, 1989.

O'Grady JG y Williams R. Classification of acute liver failure. *Lancet* 342: 743, 1993.

O'Grady JG. Acute liver failure. *Postgrad Med J* 81: 148-154, 2005.

Oertel M y Shafritz DA. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochim Biophys Acta* 1782: 61-74, 2008.

Ogata H, Kobayashi T, Chinen T, Takaki H, Sanada T, Minoda Y, Koga K, Takaesu G, Maehara Y, Iida M y Yoshimura A. Deletion of the SOCS3 gene in liver parenchymal cells promotes hepatitis-induced hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 131: 179-193, 2006.

Ohlinger VF y Thiel HJ. Identification of the viral haemorrhagic disease virus of rabbits as a calicivirus. *Rev Sci Tech* 10: 311-323, 1991.

Okabayashi T, Kariwa H, Yokota S, Iki S, Indoh T, Yokosawa N, Takashima I, Tsutsumi H y Fujii N. Cytokine regulation in SARS coronavirus infection compared to other respiratory virus infections. *J Med Virol* 78: 417-424, 2006.

Ou R, Zhang M, Huang L, Flavell RA, Koni PA y Moskophidis D. Regulation of immune response and inflammatory reactions against viral infection by VCAM-1. *J Virol* 82: 2952-2965, 2008.

Papaevangelou G, Tassopoulos N, Roumeliotou-Karayannis A y Richardson C. Etiology of fulminant viral hepatitis in Greece. *Hepatology* 4: 369-372, 1984.

Park JH, Lee YS y Itakura C. Pathogenesis of acute necrotic hepatitis in rabbit hemorrhagic disease. *Lab Anim Sci* 45: 445-449, 1995.

Parra F y Prieto M. Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J Virol* 64: 4013-4015, 1990.

Patel T y Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 21: 1725-1741, 1995.

Pauli EK, Schmolke M, Wolff T, Viemann D, Roth J, Bode JG y Ludwig S. Influenza A virus inhibits type I IFN signaling via NF-kappaB-dependent induction of SOCS-3 expression. *PLoS Pathog* 4: e1000196, 2008.

Pavanato A, Tunon MJ, Sanchez-Campos S, Marroni CA, Llesuy S, Gonzalez-Gallego J y Marroni N. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig Dis Sci* 48: 824-829, 2003.

Peng Y, Gallagher SF, Haines K, Baksh K y Murr MM. Nuclear factor-kappaB mediates Kupffer cell apoptosis through transcriptional activation of Fas/FasL. *J Surg Res* 130: 58-65, 2006.

Persico T, Savasi V, Ferrazzi E, Oneta M, Semprini AE y Simoni G. Detection of human immunodeficiency virus-1 RNA and DNA by extractive and in situ PCR in unprocessed semen and seminal fractions isolated by semen-washing procedure. *Hum Reprod* 21: 1525-1530, 2006.

Pessayre D, Haouzi D, Fau D, Robin MA, Mansouri A y Berson A. Withdrawal of life support, altruistic suicide, fratricidal killing and euthanasia by lymphocytes: different forms of drug-induced hepatic apoptosis. *J Hepatol* 31: 760-770, 1999.

Pestka S. The human interferon alpha species and receptors. *Biopolymers* 55: 254-287, 2000.

Planz O, Pleschka S y Ludwig S. MEK-specific inhibitor U0126 blocks spread of Borna disease virus in cultured cells. *J Virol* 75: 4871-4877, 2001.

Pleschka S, Wolff T, Ehrhardt C, Hobom G, Planz O, Rapp UR y Ludwig S. Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol* 3: 301-305, 2001.

Plevris JN, Schina M y Hayes PC. Review article: the management of acute liver failure. *Aliment Pharmacol Ther* 12: 405-418, 1998.

Prieto JM, Fernandez F, Alvarez V, Espi A, Garcia Marin JF, Alvarez M, Martín JM y Parra F. Immunohistochemical localisation of rabbit haemorrhagic disease virus VP-60 antigen in early infection of young and adult rabbits. *Res Vet Sci* 68: 181-187, 2000.

Purcell RH y Ticehurst JR. Enterically-transmitted non-A non-B hepatitis: epidemiology and clinical characteristics. In: *Viral Hepatitis and Liver Disease*, edited by Alan R and Liss NY. 1988, p. 131-137.

Qiu Z, Kwon AH, Tsuji K, Kamiyama Y, Okumura T y Hirao Y. Fibronectin prevents D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced lethal hepatic failure in mice. *Shock* 25: 80-87, 2006.

Ramachandran A, Parisien JP y Horvath CM. STAT2 is a primary target for measles virus V protein-mediated alpha/beta interferon signaling inhibition. *J Virol* 82: 8330-8338, 2008.

Ramadori G y Christ B. Cytokines and the hepatic acute-phase response. *Semin Liver Dis* 19: 141-155, 1999.

Ramalingaswami V y Purcell RH. Waterborne non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1: 571-573, 1988.

Ramiro-Ibanez F, Martín-Alonso JM, Garcia PP, Parra F y Alonso C. Macrophage tropism of rabbit hemorrhagic disease virus is associated with vascular pathology. *Virus Res* 60: 21-28, 1999.

Randall RE y Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 89: 1-47, 2008.

Reed JC. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol Med* 7: 314-319, 2001.

Ring-Larsen H y Palazzo U. Renal failure in fulminant hepatic failure and terminal cirrhosis: a comparison between incidence, types, and prognosis. *Gut* 22: 585-591, 1981.

Riordan SM y Williams R. Acute liver failure: targeted artificial and hepatocyte-based support of liver regeneration and reversal of multiorgan failure. *J Hepatol* 32: 63-76, 2000.

Rolando N, Gimson A, Wade J, Philpott-Howard J, Casewell M y Williams R. Prospective controlled trial of selective parenteral and enteral antimicrobial regimen in fulminant liver failure. *Hepatology* 17: 196-201, 1993.

Rolando N, Wade J, Davalos M, Wendon J, Philpott-Howard J y Williams R. The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology* 32: 734-739, 2000.

Rosell JM, Argüello JL, Badiola JI y Cuervo L. Enfermedad hemorrágica vírica. In: *Enfermedades del Conejo*, Ed. Mundi Prensa, 2002, p. 331-343.

Rosser BG y Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 108: 252-275, 1995.

Roulston A, Marcellus RC y Branton PE. Viruses and apoptosis. *Annu Rev Microbiol* 53: 577-628, 1999.

Roux PP y Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 320-344, 2004.

Rutherford A y Chung RT. Acute liver failure: mechanisms of hepatocyte injury and regeneration. *Semin Liver Dis* 28: 167-174, 2008.

Rutherford AE, Hynan LS, Borges CB, Forcione DG, Blackard JT, Lin W, Gorman AR, Shaikh OS, Reuben A, Harrison E, Reddy KR, Le WM y Chung RT. Serum apoptosis markers in acute liver failure: a pilot study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 5: 1477-1483, 2007.

Ryo K, Kamogawa Y, Ikeda I, Yamauchi K, Yonehara S, Nagata S y Hayashi N. Significance of Fas antigen-mediated apoptosis in human fulminant hepatic failure. *Am J Gastroenterol* 95: 2047-2055, 2000.

Sabat R, Kolleck I, Witt W, Volk H, Sinha P y Rustow B . Immunological dysregulation of lung cells in response to vitamin E deficiency. *Free Radic Biol Med* 30: 1145-1153, 2001.

Saeed MF, Kolokoltsov AA, Freiberg AN, Holbrook MR y Davey RA. Phosphoinositide-3 kinase-Akt pathway controls cellular entry of Ebola virus. *PLoS Pathog* 4: e1000141, 2008.

Sakaida I, Kimura T, Yamasaki T, Fukumoto Y, Watanabe K, Aoyama M y Okita K. Cytochrome c is a possible new marker for fulminant hepatitis in humans. *J Gastroenterol* 40: 179-185, 2005.

Sakamoto T, Liu Z, Murase N, Ezure T, Yokomuro S, Poli V y Demetris AJ. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* 29: 403-411, 1999.

San Miguel B, Alvarez M, Culebras JM, Gonzalez-Gallego J y Tunon MJ. N-acetyl-cysteine protects liver from apoptotic death in an animal model of fulminant hepatic failure. *Apoptosis* 11: 1945-1957, 2006.

Sanchez-Campos S, Alvarez M, Culebras JM, Gonzalez-Gallego J y Tunon MJ. Pathogenic molecular mechanisms in an animal model of fulminant hepatic failure: Rabbit hemorrhagic viral disease. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 144: 215-222, 2004.

Santana-Cabrera L, O'Shanahan-Navarro G, Garcia-Martul M, Ramirez RA, Sanchez-Palacios M y Hernandez-Medina E. Quality of artificial nutritional support in an intensive care unit. *Nutr Hosp* 21: 661-666, 2006.

Sharma P, Schaubel DE, Sima CS, Merion RM, Lok AS. Re-weighting the model for end-stage liver disease score components. *Gastroenterology* 135: 1575-1581, 2008.

Schattenberg JM, Galle PR y Schuchmann M. Apoptosis in liver disease. *Liver Int* 26: 904-911, 2006.

Schmitz V, Dombrowski F, Prieto J, Qian C, Diehl L, Knolle P, Sauerbruch T, Caselmann WH, Spengler U y Leifeld L. Induction of murine liver damage by overexpression of CD40 ligand provides an experimental model to study fulminant hepatic failure. *Hepatology* 44: 430-439, 2006.

Schneider F, Lutun P, Boudjema K, Wolf P y Tempe JD. In vivo evidence of enhanced guanylyl cyclase activation during the hyperdynamic circulation of acute liver failure. *Hepatology* 19: 38-44, 1994.

Schulze-Bergkamen H, Brenner D, Krueger A, Suess D, Fas SC, Frey CR, Dax A, Zink D, Buchler P, Muller M y Krammer PH. Hepatocyte growth factor induces Mcl-1 in primary human hepatocytes and inhibits CD95-mediated apoptosis via Akt. *Hepatology* 39: 645-654, 2004.

Schwabe RF, Bradham CA, Uehara T, Hatano E, Bennett BL, Schoonhoven R y Brenner DA. c-Jun-N-terminal kinase drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration. *Hepatology* 37: 824-832, 2003.

Sergi C, Adam S, Kahl P y Otto HF. Study of the malformation of ductal plate of the liver in Meckel syndrome and review of other syndromes presenting with this anomaly. *Pediatr Dev Pathol* 3: 568-583, 2000.

Sharma P, Schaubel DE, Sima CS, Merion RM y Lok AS. Re-weighting the model for end-stage liver disease score components. *Gastroenterology* 135: 1575-1581, 2008.

Shin YK, Liu Q, Tikoo SK, Babiuk LA y Zhou Y. Effect of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway on influenza A virus propagation. *J Gen Virol* 88: 942-950, 2007.

Sielaff TD, Hu MY, Rollins MD, Bloomer JR, Amiot B, Hu WS y Cerra FB. An anesthetized model of lethal canine galactosamine fulminant hepatic failure. *Hepatology* 21: 796-804, 1995.

Sloviter RS. Apoptosis: a guide for the perplexed. *Trends Pharmacol Sci* 23: 19-24, 2002.

Sonenshein GE. Rel/NF-kappa B transcription factors and the control of apoptosis. *Semin Cancer Biol* 8: 113-119, 1997.

Stadlbauer V, Davies NA, Sen S y Jalan R. Artificial liver support systems in the management of complications of cirrhosis. *Semin Liver Dis* 28: 96-109, 2008.

Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH y Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67: 227-264, 1998.

Stark GR. How cells respond to interferons revisited: from early history to current complexity. *Cytokine Growth Factor Rev* 18: 419-423, 2007.

Stepniak E, Ricci R, Eferl R, Sumara G, Sumara I, Rath M, Hui L y Wagner EF. c-Jun/AP-1 controls liver regeneration by repressing p53/p21 and p38 MAPK activity. *Genes Dev* 20: 2306-2314, 2006.

Strand S, Hofmann WJ, Grambihler A, Hug H, Volkmann M, Otto G, Wesch H, Mariani SM, Hack V, Stremmel W, Krammer PH y Galle PR. Hepatic failure and liver cell damage in acute Wilson's disease involve CD95 (APO-1/Fas) mediated apoptosis. *Nat Med* 4: 588-593, 1998.

Strauss G, Hansen BA, Kirkegaard P, Rasmussen A, Hjortrup A y Larsen FS. Liver function, cerebral blood flow autoregulation, and hepatic encephalopathy in fulminant hepatic failure. *Hepatology* 25: 837-839, 1997.

Strauss G, Hansen BA, Knudsen GM y Larsen FS. Hyperventilation restores cerebral blood flow autoregulation in patients with acute liver failure. *J Hepatol* 28: 199-203, 1998.

Streetz K, Leifeld L, Grundmann D, Ramakers J, Eckert K, Spengler U, Brenner D, Manns M y Trautwein C. Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 119: 446-460, 2000.

Streetz KL, Wustefeld T, Klein C, Manns MP y Trautwein C. Mediators of inflammation and acute phase response in the liver. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 47: 661-673, 2001.

Strom S y Fisher R. Hepatocyte transplantation: new possibilities for therapy. *Gastroenterology* 124: 568-571, 2003.

Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, Sanyal AJ, Cole PE, Ham JM y Posner MP. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation* 63: 559-569, 1997.

Stuehr DJ y Marletta MA. Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. *Cancer Res* 47: 5590-5594, 1987.

Sukits SF, Lin LL, Hsu S, Malakian K, Powers R y Xu GY . Solution structure of the tumor necrosis factor receptor-1 death domain. *J Mol Biol* 310: 895-906, 2001.

Sun M, Fuentes SM, Timani K, Sun D, Murphy C, Lin Y, August A, Teng MN y He B. Akt plays a critical role in replication of nonsegmented negative-stranded RNA viruses. *J Virol* 82: 105-114, 2008.

Sun R, Tian Z, Kulkarni S y Gao B. IL-6 prevents T cell-mediated hepatitis via inhibition of NKT cells in CD4+ T cell- and STAT3-dependent manners. *J Immunol* 172: 5648-5655, 2004.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM y Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-446, 1999.

Suzuki YJ, Forman HJ y Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* 22: 269-285, 1997.

Taddeo B, Zhang W, Lakeman F y Roizman B. Cells lacking NF-kappaB or in which NF-kappaB is not activated vary with respect to ability to sustain herpes simplex virus 1 replication and are not susceptible to apoptosis induced by a replication-incompetent mutant virus. *J Virol* 78: 11615-11621, 2004.

Takada Y, Ishiguro S y Fukunaga K. Large-animal models of fulminant hepatic failure. *J Artif Organs* 6: 9-13, 2003.

Takamura M, Matsuda Y, Yamagiwa S, Tamura Y, Honda Y, Suzuki K, Ichida T y Aoyagi Y. An inhibitor of c-Jun NH2-terminal kinase, SP600125, protects mice from D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatic failure by modulating BH3-only proteins. *Life Sci* 80: 1335-1344, 2007.

Takaoka A y Yanai H. Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol* 8: 907-922, 2006.

Taniguchi M, Takeuchi T, Nakatsuka R, Watanabe T y Sato K. Molecular process in acute liver injury and regeneration induced by carbon tetrachloride. *Life Sci* 75: 1539-1549, 2004.

Taub R. Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway. *J Clin Invest* 112: 978-980, 2003.

Terada T y Nakanuma Y. Detection of apoptosis and expression of apoptosis-related proteins during human intrahepatic bile duct development. *Am J Pathol* 146: 67-74, 1995.

Terblanche J y Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci* 36: 770-774, 1991.

Thomas KW, Monick MM, Staber JM, Yarovinsky T, Carter AB y Hunninghake GW. Respiratory syncytial virus inhibits apoptosis and induces NF-kappa B activity through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 277: 492-501, 2002.

Thomsen AR, Nansen A, Madsen AN, Bartholdy C y Christensen JP. Regulation of T cell migration during viral infection: role of adhesion molecules and chemokines. *Immunol Lett* 85: 119-127, 2003.

Tiberio GA, Tiberio L, Benetti A, Cervi E, Montani N, Dreano M, Garotta G, Cerea K, Steimberg N, Pandolfo G, Ferrari-Bravo A, Mazzoleni G, Giulini SM y Schiaffonati L. IL-6 Promotes compensatory liver regeneration in cirrhotic rat after partial hepatectomy. *Cytokine* 42: 372-378, 2008.

Togo S, Kubota T, Matsuo K, Shimizu T, Momiyama N, Takeda K, Tanaka K, Endo I, Sekido H y Shimada H. Mechanism of liver failure after hepatectomy. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 105: 658-663, 2004.

Tommasini I, Cerioni L, Guidarelli A y Cantoni O. ERK1/2-dependent regulation of U937 cell survival after exposure to peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun* 329: 1282-1287, 2005.

Trautwein C, Rakemann T, Brenner DA, Streetz K, Licato L, Manns MP y Tiegs G. Concanavalin A-induced liver cell damage: activation of intracellular pathways triggered by tumor necrosis factor in mice. *Gastroenterology* 114: 1035-1045, 1998.

Trey C y Davidson CS. The management of fulminant hepatic failure. *Prog Liver Dis* 3: 282-298, 1970.

Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E y Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228: 1440-1443, 1985.

Tung WH, Sun CC, Hsieh HL, Wang SW, Horng JT y Yang CM . EV71 induces VCAM-1 expression via PDGF receptor, PI3-K/Akt, p38 MAPK, JNK and NF-kappaB in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal* 19: 2127-2137, 2007.

Tunon MJ, Alvarez M, Culebras JM y Gonzalez-Gallego J. Animal models of fulminant hepatic failure. *Nutr Hosp* 22: 199-209, 2007.

Tunon MJ, Sanchez-Campos S, Garcia-Ferreras J, Alvarez M, Jorquera F y Gonzalez-Gallego J. Rabbit hemorrhagic viral disease: Characterization of a new animal

model of fulminant liver failure. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 141: 272-278, 2003.

Tygstrup N y Ranek L. Fulminant hepatic failure. *Clin Gastroenterol* 10: 191-208, 1981.

Tygstrup N y Ranek L. Assessment of prognosis in fulminant hepatic failure. *Semin Liver Dis* 6: 129-137, 1986.

Ueda K, Park JH, Ochiai K y Itakura C. Disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbit haemorrhagic disease. *Jpn J Vet Res* 40: 133-141, 1992.

Ulane CM, Rodriguez JJ, Parisien JP y Horvath CM. STAT3 ubiquitylation and degradation by mumps virus suppress cytokine and oncogene signaling. *J Virol* 77: 6385-6393, 2003.

Valla D, Flejou JF, Lebrech D, Bernuau J, Rueff B, Salzmann JL y Benhamou JP. Portal hypertension and ascites in acute hepatitis: clinical, hemodynamic and histological correlations. *Hepatology* 10: 482-487, 1989.

van den Berg R, Haenen GR, van den BH y Bast A. Transcription factor NF-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress. *Br J Nutr* 86 Suppl 1: S121-S127, 2001.

Vila-del Sol V, Diaz-Munoz MD y Fresno M. Requirement of tumor necrosis factor alpha and nuclear factor-kappaB in the induction by IFN-gamma of inducible nitric oxide synthase in macrophages. *J Leukoc Biol* 81: 272-283, 2007.

Vivanco I y Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2: 489-501, 2002.

Vlotides G, Sorensen AS, Kopp F, Zitzmann K, Cengic N, Brand S, Zachoval R y Auernhammer CJ. SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IFN-alpha-induced expression of the antiviral proteins 2,5-OAS and MxA. *Biochem Biophys Res Commun* 320: 1007-1014, 2004.

Wang HY y Cheng ML. Effects of Dan-shao-hua-xian on expression of PPAR-gamma and NF-kappa B in rat liver fibrosis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 7: 179-184, 2008.

Wang WH, Gregori G, Hullinger RL y Andrisani OM. Sustained activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun N-terminal kinase pathways by hepatitis B virus X protein mediates apoptosis via induction of Fas/FasL and tumor necrosis factor (TNF) receptor 1/TNF-alpha expression. *Mol Cell Biol* 24: 10352-10365, 2004.

Wang YM, Feng GH, Huang F, Li Y y Zhao GZ. [Tumor necrosis factor-alpha, caspase-3 expression and hepatocyte apoptosis in fulminanting hepatic failure]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 42: 566-570, 2003.

Waris G, Huh KW y Siddiqui A. Mitochondrially associated hepatitis B virus X protein constitutively activates transcription factors STAT-3 and NF-kappa B via oxidative stress. *Mol Cell Biol* 21: 7721-7730, 2001.

Waris G, Turkson J, Hassanein T y Siddiqui A. Hepatitis C virus (HCV) constitutively activates STAT-3 via oxidative stress: role of STAT-3 in HCV replication. *J Virol* 79: 1569-1580, 2005.

Waris G y Siddiqui A. Hepatitis C virus stimulates the expression of cyclooxygenase-2 via oxidative stress: role of prostaglandin E2 in RNA replication. *J Virol* 79: 9725-9734, 2005.

Webber EM, Bruix J, Pierce RH y Fausto N. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology* 28: 1226-1234, 1998.

Wei CL, Hon WM, Lee KH y Khoo HE. Temporal expression of hepatic inducible nitric oxide synthase in liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 11: 362-367, 2005.

Whitmarsh AJ y Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 74: 589-607, 1996.

Wilkinson SP, Arroyo V, Gazzard BG, Moodie H y Williams R. Relation of renal impairment and haemorrhagic diathesis to endotoxaemia in fulminant hepatic failure. *Lancet* 1: 521-524, 1974.

Willis S, Day CL, Hinds MG y Huang DC. The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *J Cell Sci* 116: 4053-4056, 2003.

Wolf D, Hallmann R, Sass G, Sixt M, Kusters S, Fregien B, Trautwein C y Tiegs G. TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the liver is under the control of TNFR1--relevance for concanavalin A-induced hepatitis. *J Immunol* 166: 1300-1307, 2001.

Wong RK y Wai CT. A bolt out of the blue: a case of unexpected acute liver failure. *Ann Acad Med Singapore* 35: 504-507, 2006.

Wurzer WJ, Ehrhardt C, Pleschka S, Berberich-Siebelt F, Wolff T, Walczak H, Planz O y Ludwig S. NF-kappaB-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation. *J Biol Chem* 279: 30931-30937, 2004.

Xie QW, Kashiwabara Y y Nathan C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269: 4705-4708, 1994.

Xu XC. COX-2 inhibitors in cancer treatment and prevention, a recent development. *Anticancer Drugs* 13: 127-137, 2002.

Xu ZJ y Chen WX. Viral haemorrhagic disease in rabbits: a review. *Vet Res Commun* 13: 205-212, 1989.

Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ y Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1441-1446, 1997.

Yang CH, Murti A, Pfeffer SR, Kim JG, Donner DB y Pfeffer LM. Interferon alpha /beta promotes cell survival by activating nuclear factor kappa B through phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. *J Biol Chem* 276: 13756-13761, 2001.

Yang SH, Lee CG, Lee CW, Choi EJ, Yoon SK, Ahn KS y Sung YC. Hepatitis C virus core inhibits the Fas-mediated p38 mitogen activated kinase signaling pathway in hepatocytes. *Mol Cells* 13: 452-462, 2002.

Yang X y Gabuzda D. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by the ERK mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Virol* 73: 3460-3466, 1999.

Yokota S, Yokosawa N, Okabayashi T, Suzutani T, Miura S, Jimbow K y Fujii N. Induction of suppressor of cytokine signaling-3 by herpes simplex virus type 1 contributes to inhibition of the interferon signaling pathway. *J Virol* 78: 6282-6286, 2004.

Yu C, Minemoto Y, Zhang J, Liu J, Tang F, Bui TN, Xiang J y Lin A. JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Mol Cell* 13: 329-340, 2004.

Zender L, Hutker S, Liedtke C, Tillmann HL, Zender S, Mundt B, Waltemathe M, Gosling T, Flemming P, Malek NP, Trautwein C, Manns MP, Kuhnel F y Kubicka S. Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7797-7802, 2003.

Zeremski M, Petrovic LM y Talal AH. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 14: 675-687, 2007.

Zerfaoui M, Suzuki Y, Naura AS, Hans CP, Nichols C y Boulares AH. Nuclear translocation of p65 NF-kappaB is sufficient for VCAM-1, but not ICAM-1, expression in TNF-stimulated smooth muscle cells: Differential requirement for PARP-1 expression and interaction. *Cell Signal* 20: 186-194, 2008.

Zhang HM, Yuan J, Cheung P, Luo H, Yanagawa B, Chau D, Stephan-Tozy N, Wong BW, Zhang J, Wilson JE, McManus BM y Yang D. Overexpression of interferon-gamma-inducible GTPase inhibits coxsackievirus B3-induced apoptosis through the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and inhibition of viral replication. *J Biol Chem* 278: 33011-33019, 2003.

Zhao DC, Yan T, Li L, You S y Zhang C. Respiratory syncytial virus inhibits interferon-alpha-inducible signaling in macrophage-like U937 cells. *J Infect* 54: 393-398, 2007.

Zhou Z, Connell MC y MacEwan DJ. TNFR1-induced NF-kappaB, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells. *Cell Signal* 19: 1238-1248, 2007.

Zhu H, Shang X, Terada N y Liu C. STAT3 induces anti-hepatitis C viral activity in liver cells. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 518-528, 2004.

Zimmers TA, McKillop IH, Pierce RH, Yoo JY y Koniaris LG. Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin 6 administration. *Hepatology* 38: 326-334, 2003.

Zou H, Li Y, Liu X y Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274: 11549-11556, 1999.