

Departamento de Ciencias Biomédicas

Área de Fisiología

EFECTOS PROTECTORES DE LA MELATONINA EN UN MODELO ANIMAL DE FALLO HEPÁTICO FULMINANTE DE ETIOLOGÍA VÍRICA

"PROTECTIVE EFFECTS OF MELATONIN IN AN ANIMAL MODEL OF FULMINANT HEPATIC FAILURE OF VIRAL ORIGIN"



Memoria que presenta la Licenciada Almudena Laliena Izquierdo para la obtención del grado de Doctora por la Universidad de León

León, 2012



UNIVERSIDAD DE LEÓN

INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)

Los Dres. Dña. Mª Jesús Tuñón González y D. Marcelino Álvarez Martínez, Directores de la Tesis Doctoral: "Efectos protectores de la melatonina en un modelo animal de fallo hepático fulminante de etiología vírica" realizada por la Doctoranda Dña. Almudena Laliena Izquierdo, en el Departamento de Ciencias Biomédicas, autorizan la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En León, a _____ de _____ de 2012.

Los Directores de la Tesis

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



UNIVERSIDAD DE LEÓN

ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO

(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y Norma 7^a de las Complementarias de la ULE)

El Departamento de Ciencias Biomédicas en su reunión celebrada el día ______ de _____ de 2012, ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada: "Efectos protectores de la melatonina en un modelo animal de fallo hepático fulminante de etiología vírica", dirigida por los Dres. Dña. M^a Jesús Tuñón González y D. Marcelino Álvarez Martínez y presentada por Dña. Almudena Laliena Izquierdo y cuyo título en inglés es "Protective effects of melatonin in an animal model of fulminant hepatic failure of viral origin".

Lo que firmo para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a _____ de ____ de 2012.

V°B° DIRECTOR DPTO.

SECRETARIA DPTO.

Fdo: Dr. Juan José García Viéitez

Fdo: Dra. Pilar Sánchez Collado

A mis padres

"I have not failed.

I've just found 10,000 ways that won't work."

Thomas A. Edison

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 Daniela, Nina, Raquel, Sara, Javi y todo el Área de Fisiología por hacer más llevadero el trabajo diario, y por supuesto a Irene y a Bea, que me han enseñado a desenvolverme en un laboratorio y me han dado ratos inolvidables durante todo este tiempo.

A todos mis amigos, por esos momentos que consiguen, a veces, que te olvides de todo lo demás. Y en especial a Bea, con quien empecé esta andadura a base de cafés y cañas.

Por último quiero agradecer a mis padres el apoyo que siempre me han dado en todas mis decisiones, a mi hermana, de la que sigo aprendiendo cada día, todos y cada uno de sus consejos, y a Fofy, la ilusión que ha mantenido por este proyecto incluso en los momentos más difíciles.

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

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

Publicaciones:

Laliena A, San-Miguel B, Crespo I, Álvarez M, González-Gallego J, Tuñón MJ. Melatonin attenuates inflammation and promotes regeneration in rabbits with fulminant hepatitis of viral origin. *Journal of Pineal Research* 2012; doi: 10.1111/j.1600-079X.2012.00995.x.

Tuñón MJ, San-Miguel B, Crespo I, Jorquera F, Santamaría E, Álvarez M, Prieto J, González-Gallego J. Melatonin attenuates apoptotic liver damage in fulminant hepatic failure induced by the rabbit hemorrhagic disease virus. *Journal of Pineal Research* 2011; 50:38-45.

Crespo I, San-Miguel B, Laliena A, Álvarez M, Culebras JM, González-Gallego J, Tuñón MJ. Melatonin prevents the decreased activity of antioxidant enzymes and activates nuclear erythroid 2-related factor 2 signaling in an animal model of fulminant hepatic failure of viral origin. *Journal of Pineal Research* 2010; 49:193-200.

Comunicaciones a congresos:

San-Miguel B, Crespo I, Laliena A, Álvarez M, González-Gallego J, Tuñón MJ. "Stimulating healthy tissue regeneration by melatonin in an animal model of fulminant hepatitis". 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Barcelona, España. 18-22 de abril, 2012. *Journal of Hepatology* 2012; 56:S170.

Laliena A, San-Miguel B, Crespo I, Vallejo D, Álvarez M, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. "Melatonin attenuates inflammation and promotes regeneration in rabbits with fulminant hepatitis of viral origin." 25rd SIS-Europe Congress on Surgical Infections. Lund, Suecia. 14-16 de junio, 2012. *Surgical Infections* 2012; 13:A-11. San-Miguel B, Laliena A, Crespo I, Vallejo D, Jorquera F, Álvarez M, González-Gallego J, Tuñón MJ. "La melatonina reduce la inflamación y promueve la regeneración hepática en conejos con fallo hepático agudo de origen vírico." XXXVII CONGRESO ANUAL de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). Madrid, España. 15-17 de febrero, 2012. *Gastroenterología y Hepatología* 2012; 35:143.

Crespo I, Álvarez M, San-Miguel B, Laliena A, Culebras JM, González-Gallego J, Tuñón MJ. "Increase of ciytokines and lack of regeneration in rabbit hemorrhagic disease, an animal model of virally induced fulminant hepatic failure". 24th European Congress on Surgical Infection. León, España. 25-28 de mayo, 2011. *Surgical Infections* 2011; 12:A-14.

Crespo I, San-Miguel B, Laliena A, Müller-Prause C, Álvarez M, González-Gallego J y Tuñón MJ. "Melatonin administration reduces activity of antioxidant enzymes and activates nuclear eriyhroid 2-related factor 2 signalling in an animal model of fulminant hepatic failure of viral origin." International Symposium on the Pathophysiology of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. Salamanca, España. 19-21 de mayo, 2010.

Abreviaturas utilizadas

ADN	ácido desoxirribonucleico
AIF	factor inductor de apoptosis
ARE	elemento de respuesta antioxidante
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosín trifosfato
ALT	alanina amino transferasa
AST	aspartato amino transferasa
Bcl-2	gen 2 del linfoma de células B
BR	bilirrubina
CAT	catalasa
CID	coagulación intravascular diseminada
Cit-c	citocromo c
dATP	desoxiadenosín-trifosfato
EEM	error estándar de la media
EDTA	ácido etilén diamino tetraacético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico
EH	encefalopatía hepática
ERK	quinasa regulada por señales extracelulares
EROs	especies reactivas de oxígeno
FHF	fallo hepático fulminante

GABA	ácido gamma amino butírico
GPx	glutatión peroxidasa
GR	glutatión reductasa
GSH	glutatión (forma reducida)
GSSG	disulfuro de glutatión (forma oxidada)
GPx	glutatión peroxidasa
GST	glutatión S-transferasa
HGF	factor de crecimiento de hepatocitos
HMGB-1	proteína del grupo de alta movilidad Box1
HIOMIT	hidroxiindol-O-metil transferasa
HP	hepatectomía parcial
hpi	horas postinfección
HSC	células estrelladas hepáticas
IL	Interleucina
INF-α	interferón-α
JNK	quinasa N-terminal de c-Jun
Kb	kilobases
Keap1	proteína represora-1 asociada a ECH
LCR	líquido cefalorraquídeo
LDH	lactato deshidrogenasa
МАРК	proteínas quinasas activadas por mitógenos
MEC	matriz extracelular
c-Met	receptor del factor de crecimiento de hepatocitos
MMPs	metaloproteinasas de la matriz extracelular
NAD+	nicotín adenín dinucleótido (forma oxidada)

NADP	nicotín adenín dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADH	nicotín adenín dinucleótido (forma reducida)
NADPH	nicotín adenín dinucleótido fosfato (forma reducida)
NAT	N-acetil-transferasa
NF-ĸB	factor de transcripción nuclear kappa B
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintetasa
Nrf2	factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2
O ₂ ·	radical anión superóxido
ОН∙	radical hidroxilo
Pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
Pm	peso molecular
PIC	presión intracraneal
PPAR-1	poli-ADP-ribosa-polimerasa-1
PTH	poro de permeabilidad mitocondrial
REL	retículo endoplásmico liso
RHD	enfermedad hemorrágica del conejo
RHDV	virus de la enfermedad hemorrágica del conejo
RL	radical libre
RT-PCR	transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
SNC	sistema nervioso central
SOD	superóxido dismutasa

SODm	superóxido dismutasa mitocondrial
SSF	suero salino fisiológico
TAE	tampón acético tris/EDTA
TBARS	sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TEMED	tetrametiletilendiamina
TGF-α	factor de crecimiento epidérmico-α
тн	trasplante hepático
TLR	receptor tipo "toll"
TIMP	inhibidor tisular de las metaloproteinasas
TNF-α	factor de necrosis tumoral-α
TNFR	receptor del factor de necrosis tumoral
ТР	tiempo de protrombina
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
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
γ-GTCS	γ-glutamilcisteina sintetasa
γ-GT	γ-glutamiltranspeptidasa

Índice

1	IN	TRO	ODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
2	RE	EVIS	SIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
	2.1	E	l fallo hepático fulminante	7
	2.1	.1	Etiología	8
	2.1	.2	Clínica	
		2.1.2	.1 Alteraciones del sistema nervioso central	
	:	2.1.2	.2 Alteraciones renales y del equilibrio ácido-base	
		2.1.2	.3 Alteraciones respiratorias	
	:	2.1.2	.4 Alteraciones de la coagulación	
	:	2.1.2	2.5 Alteraciones metabólicas	
	2.1	.3	Anatomía patológica	19
	2.1	.4	Diagnóstico	20
	2.1	.5	Clasificación	20
	2.1	.6	Tratamiento	22
	2.1	.7	Modelos animales de fallo hepático fulminante	28
	:	2.1.7	.1 Modelos quirúrgicos	
	:	2.1.7	2.2 Modelos inducidos por sustancias químicas	
		2.1.7	7.3 Modelos víricos	
	2.1	.8	La enfermedad hemorrágica del conejo como modelo de fa	llo hepático
fuln	ninante			34
	:	2.1.8	8.1 Etiología	
		2.1.8	2.2 Patogenia	
	:	2.1.8	8.3 Cuadro clínico	
		2.1.8	8.4 Lesiones	
	2.2	Μ	lecanismos moleculares del FHF	41
	2.2	.1	Estrés oxidativo	41
	2.2	.2	Defensas antioxidantes	43
		2.2.2	.1 Glutatión	
		2.2.2		
	:	2.2.2	.3 Importancia del estrés oxidativo en el FHF	
	2.2	.3	La inflamación	50

	2.2	3.1	La inflamación hepática	52
	2.2	.3.2	Importancia de la inflamación en el FHF	55
	2.2.4	La	a apoptosis	56
	2.2	.4.1	Vías de la apoptosis	59
	2.2	.4.2	Familia Bcl-2	61
	2.2	.4.3	Caspasas	63
	2.2	.4.4	Importancia de la apoptosis en el FHF	64
	2.2.5	Pr	roteínas quinasas activadas por mitógenos	65
	2.2.6	Re	egeneración hepática	66
	2.2	.6.1	Señalización por citoquinas	
	2.2	.6.2	Señalización por factores de crecimiento	69
2	2.3	La n	1elatonina	71
	2.3.1	Bi	iosíntesis	72
	2.3.2	Di	istribución	76
	2.3.3	М	etabolismo y farmacocinética	78
	2.3.4	Μ	ecanismo de acción	78
	2.3	.4.1	Mecanismos mediados por receptor	79
	2.3.5	Fι	unción antioxidante de la melatonina	81
	2.3	5.1	Acciones directas de la melatonina	
	2.3.6	01	tras funciones de la melatonina	83
	2.3.7	La	a melatonina y el hígado	
3	MAT	ERI	AL Y MÉTODOS	
3	B.1	Apa	ratos	89
3	3.2	- Solu	ciones	90
3	3.3	Anir	nales	90
3	3.4	Dise	no experimental	91
	3.4.1	01	- btención del inóculo vírico	
	3.4.2	Ti	tulación del virus	
	3.4.3	In	oculación de los animales y grupos experimentales	92
	3.4.4	Re	ecogida de muestras	93
3	3.5	Méte	odos analíticos	94
	3.5.1	De	eterminaciones en plasma	94
	3.5	1.1	Actividad de la aspartato aminotransferasa (AST)	94
	3.5	.1.2	Actividad de la alanino aminotransferasa (ALT)	94
	3.5.2	D	eterminaciones en sangre	95
	3.5	.2.1	Concentración de glucosa	95

3.5.3	3 Det	erminaciones en hígado	95
3.	.5.3.1	Obtención de homogeneizado total	
3.	.5.3.2	Obtención de las fracciones citosólica y nuclear	
3.	.5.3.3	Concentración de proteína	97
3.	.5.3.4	Concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TB	ARS)97
3.	.5.3.5	Concentración de glutatión reducido (GSH)	
3.	.5.3.6	Concentración de glutatión oxidado (GSSG)	
3.	.5.3.7	Actividad de la glutatión S-transferasa (GST)	100
3.	.5.3.8	Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)	100
3.	.5.3.9	Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)	102
3.	.5.3.10	Western blot	102
3.	.5.3.11	Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)	104
3.	.5.3.12	Extracción, purificación y cuantificación del ARN	105
3.	.5.3.13	Tratamiento del ARN con ADN-asas	107
3.	.5.3.14	Reacción de la transcripción reversa	108
3.	.5.3.15	Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real (RT-PCR)	109
3.	.5.3.16	Estudio inmunohistoquímico	112
3.	.5.3.17	Actividad de las caspasas 3, 8 y 9	113
3.5.4	4 Tra	tamiento estadístico	114
4 RES	SULTA	DOS	115
4.1	Efecto	os del RHDV y la melatonina sobre diversos parámetros	
plasmáticos y	y marca	adores de estrés oxidativo	117
4.2	Efecto	os del RHDV y la melatonina sobre la expresión y activida	ad de
diversas enzi	mas ar	ntioxidantes	119
4.3	Efecto	os del RHDV y la melatonina sobre la expresión y activac	ión
del Nrf2			
4.4	Efecto	o del RHDV y la melatonina sobre la inflamación henátic	a 124
4 5	Ffecto	o del RHDV y la melatonina sobre la anontosis henática	129
1.5	Efect	del PHDV y la melatonina on la ragonoración honótica	120
7.0	Liett	o del Kilov y la melatolina en la regeneración nepatica.	150
5 DIS	CUSIÓ	N	143
5.1	Efecto	o del RHDV y la melatonina sobre diversos parámetros	
plasmáticos d	de daño	o hepático	145
5.2	Efecto	o del RHDV y la melatonina sobre el estrés oxidativo y la	S
defensas anti	ioxidan	ites	145
5.3	Efecto	os del RHDV y la melatonina sobre la inflamación hepátic	ca 149

	5.4	Efectos del RHDV y la melatonina sobre la apoptosis hepática 152
	5.5	Efecto del RHDV y la melatonina sobre la regeneración hepática 155
6	CON	NCLUSIONES159
	6.1	Primera conclusión161
	6.2	Conclusión segunda161
	6.3	Conclusión tercera161
	6.4	Conclusión cuarta
	6.5	Conclusión final162
7	SUN	163 MARY
	7.1	Introduction and Objectives165
	7.2	Materials and methods167
	7.3	Results 174
	7.4	Discussion181
8	CON	NCLUSIONS191
	8.1	First conclusion193
	8.2	Second conclusion
	8.3	Third conclusion193
	8.4	Fourth conclusion
	8.5	Final conclusion194
9	BIB	LIOGRAFÍA

Figura	1.	Etiología del FHF en diferentes países.	9
Figura	2.	Afectaciones sistémicas del FHF 1	2
Figura	3.	Estructura del RHDV	36
Figura	4.	Estrés oxidativo causado por los radicales libres4	13
Figura	5.	Ciclo de oxido-reducción del glutatión4	15
Figura	6.	Vía de señalización del factor de transcripción Nrf2 4	19
Figura	7.	Grupos de citoquinas proinflamatorias5	52
Figura	8.	Diferencias entre la muerte celular por apoptosis y por necrosis5	57
Figura	9.	Señalización de la familia de proteínas Bcl-26	32
Figura	10.	Biosíntesis de melatonina7	'4
Figura	11.	Estimulación o inhibición de la síntesis de melatonina7	'5
Figura	12.	Titulación del virus de la RHD por la técnica de hemoaglutinación	92
Figura	13.	Actividad plasmática de ALT y AST 11	7
Figura	14.	Concentración de glucosa en sangre 11	8
Figura	15.	Concentración hepática de TBARS 11	8
Figura	16.	Relación hepática GSSG/GSH 11	9
Figura GF	17. ^р х у	Actividad hepática de las enzimas antioxidantes Mn-SOD, Cu,Zn-SOD, GST	20
Figura GF	18. ⁵ x y	Contenido de ARNm de las enzimas antioxidantes Mn-SOD, Cu,Zn-SOD, GST	21

Figura	19.	Expresión hepática del factor de transcripción Nrf2	122
Figura	20.	Detección inmunohistoquímica del factor de transcripción Nrf2	124
Figura	21.	Expresión hepática de la proteína Keap1	123
Figura	22.	Activación del factor Nrf2 y su unión a ARE	124
Figura	23.	Contenido de ARNm de la proteína TLR4	127
Figura	24.	Expresión hepática de la proteína TLR4	125
Figura	25.	Contenido de ARNm de la proteína HMGB-1	126
Figura	26.	Expresión hepática de la proteína DAF	129
Figura	27.	Contenido de ARNm de IL-1 β , IL-6, TNF- α y CRP	130
Figura	28.	Contenido de ARNm de MMP-9	131
Figura	29.	Actividad hepática de la caspasa 3	132
Figura	30.	Detección inmunohistoquímica de la caspasa 3	132
Figura	31.	Expresión hepática de la proteína PARP-1	133
Figura	32.	Expresión hepática de la proteína Bax	134
Figura	33.	Expresión hepática del Cit-c	135
Figura	34.	Actividad hepática de la caspasa 9	135
Figura	35.	Expresión hepática de las proteínas Bcl-2 y Bcl-xL	136
Figura	36.	Actividad hepática de la caspasa 8	137
Figura	37.	Expresión hepática de Fas-L	138
Figura	38.	Expresión hepática de TNF-R1	138
Figura	39.	Expresión hepática de la proteína c-FLIP	139
Figura	40.	Expresión hepática de la quinasa JNK y su forma fosforilada	140

Figura 41. Contenido de ARNm del factor de crecimiento HGF y su receptor c-Met 141	
Figura 42. Expresión hepática del factor de crecimiento HGF y su receptor c-Met 141	
Figura 43. Contenido de ARNm de los factores de crecimiento PDGF-B, EGF y VEGF y sus receptores PDGFR-β, EGFR y VEGFR	
Figura 44. Expresión hepática de las proteínas ERK y STAT-3 143	

Tabla 1. Diferentes etiologías de la inflamación hepática	53
Tabla 2. Secuencias específicas utilizadas para la RT-PCR por Syber Green	111
Tabla 3. Sondas específicas utilizadas para la RT-PCR por Taqman	111

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El fallo hepático fulminante es un síndrome clínico muy grave resultante de la necrosis hepática y del fallo funcional del parénquima hepático, de rápida progresión, en un hígado previamente sano, asociado con una alta mortalidad (60-90%), a pesar de los grandes avances que se han producido en los últimos años en la terapia tanto del manejo de los cuidados intensivos mediante diversos soportes hepáticos bioartificiales como del trasplante hepático. Se caracteriza por la presencia de encefalopatía hepática junto con signos de insuficiencia hepatocelular, especialmente ictericia y coagulopatía. La mayoría de los pacientes experimentan un deterioro rápido y mueren a no ser que reciban un trasplante de urgencia. Solo un bajo porcentaje de estos pacientes recupera la función hepática normal.

El mayor conocimiento de los mecanismos patogénicos involucrados en el desarrollo del fallo hepático fulminante tiene gran importancia en la búsqueda de nuevas modalidades terapéuticas por lo que se considera que el uso de modelos animales que brinden la oportunidad de investigar sobre esta grave patología tiene una gran trascendencia. De hecho, aunque una de las principales etiologías de fallo hepático fulminante es de naturaleza vírica, la mayor parte de los modelos desarrollados hasta el momento son quirúrgicos o utilizan sustancias químicas y no reflejan de modo idóneo el patrón de la enfermedad humana de fallo hepático fulminante. Trabajos previos de nuestro grupo de investigación han comprobado que la enfermedad hemorrágica del conejo presenta características bioquímicas, histológicas y signos clínicos compatibles con el fallo hepático fulminante del hombre por lo que cumple los requisitos necesarios para ser considerado como modelo animal del fallo hepático fulminante humano. Aún se desconocen los mecanismos patogénicos precisos que conducen al desenlace fatal de esta patología y, por otra parte, continúa la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas que al menos aumenten la subsistencia de los pacientes a la espera de un posible trasplante.

El estrés oxidativo es un hallazgo común en las diferentes etiologías del fallo hepático y juega un papel fundamental en este modelo, ya que induce la apoptosis de los hepatocitos y contribuye de forma importante a la fisiopatología del fallo hepático fulminante, numerosos estudios relacionan el estrés oxidativo con la apoptosis. En el fallo hepático fulminante la apoptosis es la primera respuesta celular ante las principales agresiones. De hecho, se ha indicado que su inhibición previene la inflamación que se desarrolla en esta patología.

Por último, la regeneración hepática es también una respuesta fundamental del hígado ante el daño tisular y se considera que el índice de regeneración hepática puede ser crítico en el pronóstico de estos pacientes. Sin embargo, no existen terapias disponibles capaces de estimular la regeneración.

La melatonina es una molécula que posee una gran capacidad de atravesar membranas lipídicas por difusión simple y es un potente depurador de radicales libres. Sus efectos protectores han sido ampliamente estudiados en diferentes modelos experimentales de enfermedades hepáticas.

Por todo ello, en este estudio el principal objetivo ha sido comprobar el posible efecto protector de la administración de melatonina en conejos infectados con el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo, modelo animal de fallo hepático fulminante de etiología vírica. Para ello se ha tratado de estudiar sus efectos sobre el estrés oxidativo, la apoptosis y la inflamación en el FHF producido por el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo, así como sobre la regeneración hepática en los conejos infectados.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El fallo hepático fulminante

El término *fallo hepático fulminante* (FHF) fue definido 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 (Wlodzimirow y cols., 2012).

El FHF es un síndrome clínico muy grave asociado con una alta morbilidad y mortalidad (Lee, 1993; Nguyen y Vierling 2011) a pesar de los grandes avances que se han producido en los campos tanto del manejo de los cuidados intensivos como en el trasplante hepático (TH) (Plevris y cols., 1998; Nguyen y Vierling 2011). 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 Williams, 1993). Las etiologías del FHF son muy diversas, con variaciones geográficas, e incluyen hepatitis víricas, hepatotoxinas, anormalidades cardiovasculares. hepatitis autoinmunes. alteraciones metabólicas ۷ anormalidades anatómicas del hígado; no obstante, en una gran proporción de pacientes su etiología es desconocida (Riordan y Williams, 2000). Una estimación razonable del índice de supervivencia del FHF es de un 20-25% de los pacientes, con excepción de la intoxicación con paracetamol que presenta una tasa de recuperación de casi el 50% de los casos (Bernal, 2003).

El FHF no se considera como una enfermedad, sino como 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 menor función celular hepática, siendo un buen índice el alargamiento del tiempo de protrombina (TP) 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). No obstante, en los últimos años, el diagnóstico ha mejorado notablemente, disminuyendo los casos de etiología indeterminada (Germani y cols., 2012). En la mayoría de los casos el FHF es originado principalmente por infecciones víricas, especialmente por el virus de la hepatitis B (VHB) pero también por el de la hepatitis A (VHA) y el de la hepatitis E (VHE) (Acharya y cols., 2000). Ahora bien, en países como el Reino Unido y en los EEUU, más del 65% de los casos de FHF son debidos a drogas y fármacos siendo la intoxicación por paracetamol la principal responsable es el VHB mientras que la intoxicación por paracetamol es la causa de un bajo número de casos; y en uno de cada tres casos no se conoce su etiología (Escorsell y cols., 2007) (Figura 1).

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

- 1. Infecciosas
- 2. Fármacos, toxinas y venenos

3. No tóxicas ni infecciosas: vasculares, metabólicas, misceláneas, indeterminadas

La hepatitis vírica aguda constituye una de las causas más frecuentes de FHF, aunque con una variabilidad geográfica en su prevalencia que puede oscilar desde el 72% en París al 33% en Londres (Bernuau y cols., 1986;

8
O'Grady y cols., 1989), con un valor del 40% en el caso de España (Escorsell y cols., 2007; Mas y cols., 2010). Los principales virus implicados son los VHA, VHB, VHD y VHE.



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

Aunque el VHA es el más frecuente, rara vez se complica en FHF, con una incidencia que oscila entre el 0,14 y el 0,35% de los casos hospitalizados; además, del conjunto de las hepatitis víricas que pueden evolucionar de forma fulminante es la que tiene el mejor pronóstico. En el caso del VHB el riesgo de desarrollar FHF es mucho mayor, detectándose entre el 1 y el 4% de los casos, y llegando a ser responsable del 70% de los casos de origen vírico (Papaevangelou y cols., 1984). Las hepatitis producidas por el VHE provocan FHF principalmente en mujeres en el tercer trimestre de embarazo con gran incidencia en zonas de África y Asia (Ramalingaswami y Purcell, 1988).

Otros virus implicados en el FHF son los herpes simples tipo 1 y 2, varicela-zoster, citomegalovirus, Epstein-Barr, adenovirus, paramixovirus y de forma aislada se han comunicado casos atribuibles a parvovirus B19, cosackie B y arbovirus, principalmente en pacientes inmunodeprimidos (Bernuau y cols., 1986; Liang y cols., 1993., Langnas y cols., 1995; Feranchak y cols., 1998).

Con excepción de la hepatitis por paracetamol, que es frecuente en algunos países, la hepatitis debida a intoxicaciones provoca únicamente el 1-2% de los casos de FHF y en ocasiones se determina la etiología tóxica por exclusión de otras causas (Bernuau y cols., 1986; Abboud y Kaplowitz, 2007). El paracetamol es la causa del 50 al 60% de los casos de insuficiencia hepática fulminante en el Reino Unido (O'Grady y cols., 1989), 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 ha estimado en más de 26.000 casos al año en EEUU (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 o los inhibidores de la monoamino oxidasa, sobre todo si se asocian con inductores enzimáticos (Boelsterli y cols., 1995) y algunos antiepilépticos (Björmsson, 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).

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

2.1.2 Clínica

Tanto las manifestaciones clínicas como los datos de laboratorio son comunes en las diferentes etiologías, salvo peculiaridades específicas. La EH constituye un criterio diagnóstico. Casi siempre, la hiperbilirrubinemia es de tipo conjugado y la ictericia es un signo precoz y rápidamente progresivo (Lee, 1993). Hay un descenso 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 con un peor pronóstico. Es habitual la circulación hiperdinámica, caracterizada por taquicardia, hipotensión, aumento del gasto cardíaco y una disminución de las resistencias periféricas, relacionado todo ello con un desequilibrio entre factores vasodilatadores y factores vasoconstrictores a favor de los primeros.

Los pacientes con FHF desarrollan infecciones frecuentes de origen entérico, siendo 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.

En el siguiente apartado se analizarán por sistemas las características clínicas y la patogenia de su afectación en el curso del FHF (Figura 2).



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

2.1.2.1 Alteraciones del sistema nervioso central

La patogenia de la EH no es todavía muy conocida, no obstante los dos factores de mayor importancia 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 inhibidor (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 hemato-encefálica. No obstante, existen varias observaciones que van en contra de que el amonio sea el único factor en el desarrollo de la encefalopatía: a) la pobre correlación entre su concentración en plasma y LCR y la gravedad de la encefalopatía; b) la aparición de

encefalopatía con niveles de amonio normales; c) el hecho de que concentraciones bajas de amonio producen excitación en lugar de neurodepresión (Jalan y Haynes, 1997). Por ello, se ha propuesto que juegan un importante 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 inhibidores. Por un lado, el glutamato es el neurotransmisor excitador más importante en el cerebro; en la encefalopatía sus niveles están reducidos, los mecanismos de recaptación están alterados y los sitios de unión presentan una regulación a la baja. Por otro lado, el GABA es el principal neurotransmisor inhibidor y su tono está aumentado en la EH, lo que se asocia con alteraciones de la función motora y la depresión de conciencia, dos manifestaciones cardinales de la encefalopatía. Se desconoce el mecanismo por el cual dicho tono aumenta (Basile y Jones, 1997).

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, contribuye a las manifestaciones de la EH ya sea potenciando la neurotransmisión GABAérgica o aumentando sinérgicamente la acción de los agonistas endógenos del receptor benzodiacepínico. 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 benzodiacepinas y racionalizan 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 EH, como desorden metabólico, afecta el nivel de consciencia de estos pacientes, también el edema cerebral con aumento concomitante de la presión intracraneal (PIC), siendo la causa más frecuente de muerte en los casos de FHF. Generalmente progresa siguiendo cuatro etapas que van desde

13

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 únicamente a órdenes simples, clonus, Babinski y rigidez. El aumento de la PIC es poco frecuente en pacientes con encefalopatía grado I/II; no obstante, en las etapas tempranas 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 grado III/IV (Lee, 1993; Mas y Rodes, 1997). El edema cerebral puede conducir a herniación cerebral y muerte (Lee, 2012).

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

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

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

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, que agrava el pronóstico. La azoemia no es un buen indicador de la función renal debido a la disminución de la síntesis de

urea por el hígado, por ello, se prefiere la creatininemia (Ring-Larse y Palazzo, 1981).

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

El fallo renal funcional, al igual que en la cirrosis, se relaciona con el desequilibrio entre los factores neurohumorales vasoconstrictores y vasodilatadores renales. De manera que, al igual que en los pacientes cirróticos con síndrome hepatorrenal, los pacientes con FHF e insuficiencia renal exhiben una grave vasoconstricción renal con disminución de la perfusión renal y del filtrado glomerular, con una función tubular conservada en el contexto de una marcada vasodilatación sistémica (Lee, 1996). El pronóstico del síndrome hepatorrenal es desfavorable con una mortalidad del 90%.

Aproximadamente un 50% de los pacientes con FHF exhiben signos clínicos asociados con hipertensión portal como ascitis y síndrome hepatorrenal. Se ha sugerido que la hipertensión portal podría estar causada por un aumento de la resistencia hepática al flujo sanguíneo portal como consecuencia del colapso sinusoidal y 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, que sugiere retención acuosa y disminución de depuración del agua libre, se debe a una disminución del filtrado glomerular que determina una menor llegada de orina primaria a los segmentos distales de la nefrona, junto con el aumento de la hormona antidiurética. La hipofosfatemia es común particularmente en casos de sobredosis por paracetamol (Valla y cols., 1989).

16

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

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

2.1.2.3 Alteraciones respiratorias

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

A nivel macrocirculatorio, el patrón típico del FHF es muy similar al de la sepsis, con 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).

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 TP se prolonga, (en general por encima del 50%), siendo éste un elemento pronóstico. El factor VII es el primero en disminuir por su vida media corta y el aumento del catabolismo le afecta poco. El descenso de este factor indica que el daño hepático ha ocurrido independientemente de los factores dependientes de vitamina K y es un factor pronóstico y de seguimiento evolutivo. La concentración de fibrinógeno es la última en disminuir, ya que el hígado preserva la capacidad de sintetizarlo hasta las etapas finales del FHF.

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

2.1.2.5 Alteraciones metabólicas

Una situación frecuente, ya que se produce en más del 40% de los casos de FHF, es la hipoglucemia, secundaria a la alteración de la gluconeogénesis y a los bajos niveles de glucógeno hepático (Lee, 1996). Por otra parte, los niveles de insulina están elevados por una disminución de su metabolismo, lo que aumenta su vida media; este aspecto, junto con la hiponatremia, puede explicar parte de las manifestaciones encefálicas.

La presencia de hipoglucemia constituye otro elemento pronóstico. No es raro que estos pacientes presenten una pancreatitis asociada, además el

colesterol suele presentar niveles bajos y los ácidos grasos libres están aumentados en plasma.

2.1.3 Anatomía patológica

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

2.1.4 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 bilirrubina (BR) total a expensas de la directa, prolongación del TP (por encima del 50%) y disminución del nivel plasmático del factor V. En general, la prolongación del TP por encima del 50% precede en horas o semanas a la aparición de encefalopatía clínicamente evidente (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 escasa ictericia; en cambio, en los pacientes con FHF por hepatitis vírica, a menudo se presenta con intensa ictericia pero con menos probabilidad de desarrollar edema cerebral (Lee, 1993; McPhail y cols., 2010).

2.1.5 Clasificación

Desde que en 1970 Trey y Davidson propusieran una definición para el FHF, algunos autores han aportado distintas clasificaciones con el objetivo de establecer un pronóstico y una acción terapéutica en cada caso basándose fundamentalmente en la duración del periodo de tiempo transcurrido entre el inicio de los síntomas clínicos o la aparición de ictericia y el desarrollo de encefalopatía. Así en el King's College Hospital de Londres, O'Grady y Williams, en base al análisis de 635 pacientes comprendidos entre 1972 y

1985, proponen 3 categorías (O'Grady y Williams., 1993; McPhail y cols., 2010):

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 TH (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):

 I.- Fallo hepático fulminante: cuando la encefalopatía se desarrolla dentro de las 2 semanas de iniciada la ictericia.

2.- Fallo hepático subfulminante: cuando el intervalo entre la ictericia y la encefalopatía se sitúa entre las 2 y 12 semanas.

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

2.1.6 Tratamiento

Una vez establecido el diagnóstico de FHF, una premisa inicial en el manejo de este tipo de pacientes, es el traslado de los mismos a una unidad de cuidados intensivos de un centro hospitalario donde se lleven a cabo trasplantes hepáticos (Bernuau, 2004). El tratamiento curativo de los pacientes con FHF depende del tratamiento médico y del 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 ingreso de los pacientes en unidades de cuidados intensivos especializadas en el manejo de los mismos, permite el control de muchas de las complicaciones que presentan y aumenta las posibilidades de que el paciente permanezca vivo en espera de la recuperación espontánea de la función hepática o de la llegada de un órgano (Lee, 2012). A la hora de considerar el tratamiento médico se deben tener en cuenta tres máximas fundamentales: 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). Es muy importante la atención de estos enfermos en una Unidad de Cuidados Intensivos, tanto mejor cuanta más experiencia tenga con pacientes de este tipo, y con habilidad para el tratamiento del fallo multiorgánico (Tygstrup y Ranek, 1986).

Un aspecto crucial en el tratamiento de FHF lo constituye el manejo de la insuficiencia renal. Puede estar indicada la terapéutica de sustitución renal durante el intervalo de espera del órgano, o como complemento del TH, debido a que el edema cerebral grave se acompaña a menudo de insuficiencia renal importante. La diálisis no es por si misma un tratamiento eficaz y además puede tener efectos perjudiciales al eliminar factores plasmáticos solubles que podrían intervenir 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 hipoxemia, hipoglucemia, hiponatremia, hipofosfatemia y acidosis metabólica, deben prevenirse y corregirse (Jalan, 2005).

La PIC debe monitorizarse fundamentalmente en los casos de EH avanzada (a partir del grado III). Esta técnica lleva consigo riesgo de complicaciones pero la colocación de sensores de presión intracraneales, colocados preferentemente en posición epidural, que disminuye el riesgo de complicaciones, se ha mostrado de gran eficacia para la prevención de la herniación cerebral secundaria al edema así como para la selección de pacientes tributarios de TH (Córdoba, 2002).

El manejo de los trastornos metabólicos obliga a administrar bolos adicionales de dextrosa y a monitorizar cuidadosamente las cifras de glucemia para detectar y corregir las hipoglucemias, que son asintomáticas la mayoría de las veces. Hay también que corregir la hipofosfatemia. La alcalosis no debe tratarse. Si existe acidosis metabólica hay que diagnosticar y tratar los factores desencadenantes y perfundir bicarbonato sódico o recurrir incluso a hemodiálisis (Lee, 1996).

Debido a que los trastornos de la coagulación constituyen el elemento pronóstico más valioso en la insuficiencia hepática, no debe intentarse corregirlos si no hay hemorragias. La administración de plasma fresco congelado no mejora la supervivencia, modifica el estado de la coagulación que al ser el pronóstico más fiel expone al paciente a la indicación inadecuada del TH. La trombopenia obliga algunas veces a transfundir plaquetas junto con pequeñas cantidades de heparina para impedir que aumente la CID (Lee, 1996).

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. No está demostrada todavía la utilidad terapéutica de los antibióticos empleados profilácticamente. 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 (Rolando y cols., 1993; 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 epidérmico- β (TGF- β) en un modelo de FHF en ratas provocado por tetracloruro de carbono, aumentó 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, muy probablemente

24

por bloquear los receptores de la membrana hepatocitaria para el ácido γaminobutírico, un inhibidor de la regeneración hepática, cuyos niveles están muy elevados en el FHF (Kaita y cols., 1998).

En la regeneración hepática están implicadas una compleja red de citoquinas y factores de crecimiento que actúan de una manera ordenada; se ha observado que la anfirregulina, un factor de crecimiento, contribuye a la regeneración hepática en sus fases más tempranas tanto en cultivos celulares como en estudios in vivo pudiendo tener aplicaciones terapéuticas en la fabricación de medicamentos para el daño hepático agudo (Berasain y cols., 2005). 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 citoquina perteneciente a la familia de la IL-6, como un factor de supervivencia de hepatocitos, que reduce de forma eficiente el daño hepatocelular en modelos animales de FHF (Bustos y cols., 2003; Marqués y cols., 2007; Tuñón y cols., 2011).

A pesar de lo comentado, el TH constituye hoy en día el único tratamiento curativo del FHF del hombre (Nevens y Laleman, 2012). Suele realizarse el TH ortotópico, 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). La muerte cerebral preoperatoria o postoperatoria es una importante causa de mortalidad que afecta sobre todo a los pacientes en los que se asocia el FHF con la insuficiencia respiratoria aguda preoperatoria. El principal requisito previo para el TH en los pacientes afectados de FHF es llegar a un pronóstico individual exacto, ya que esta decisión debe contemplar la posibilidad de trasplantar a un paciente que no lo requiera porque podría

tener una recuperación espontánea y, consecuentemente, sería sometido a un riesgo quirúrgico y por inmunosupresión innecesario, o, por el contrario, no dar la oportunidad de trasplante a alguien que no sobreviviría sin él. Esta decisión tienen que tomarla hepatólogos con experiencia en pacientes afectos 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, pero que no se había llevado a cabo por falta de donante. Estas recuperaciones inesperadas hacen imposible asegurar que algunos pacientes pudieran 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 adecuen a la selección de pacientes en nuestro medio, son los utilizados por el King's College Hospital (O'Grady y cols., 1989).

Debido a la cada vez mayor demanda de órganos para el trasplante y la escasez de éstos, se han desarrollado técnicas para mejorar su uso y para emplear un mismo órgano entre dos receptores. Así, se han mejorado las técnicas de TH auxiliar, de hígado dividido y TH de donante vivo relacionado.

El TH 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 TH de donante vivo relacionado consiste en que uno de los padres cede al niño el lóbulo

26

izquierdo o el segmento lateral izquierdo de su hígado. Este método permite que el trasplante sea rápido y el órgano de gran calidad (McCarthy y Wilkinson, 1999; O'Grady, 2007).

En los últimos años se han desarrollado una serie de técnicas y tratamientos tales como los sistemas artificiales de apoyo hepático, o el trasplante de hepatocitos, que es menos invasiva y puede efectuarse repetidas veces, siendo una alternativa al trasplante total del órgano (Bilir y cols., 2000; Nguyen y Vierling, 2011). 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 (Bilir y cols., 2000).

Los sistemas de apoyo hepático deben cumplir cuatro objetivos: 1) mantener la función metabólica del hepatocito, 2) estabilizar otros órganos críticos, 3) disminuir las complicaciones extrahepáticas y 4) promover la regeneración hepática. 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 (Stadlbauer y cols., 2008).

Los dos sistemas de soporte que ofrecen en la actualidad los mejores resultados son el MARS (Molecular Adsorbent Recirculating System) (Stange y cols., 1999) y el Prometheus (Fractionated Plasma Separation, Adsorption and Dialysis) (Rifai y cols., 2003). MARS destoxifica a través de una membrana con albúmina humana exógena y Prometheus hace pasar el plasma por dos columnas encargadas de la detoxificación, ambas constan de un circuito de diálisis convencional (Hessel y cols., 2010; Nevens y Laleman, 2012). Sin embargo, son necesarios más datos clínicos que puedan avalar su eficacia en pacientes con FHF (Rademacher y cols., 2011).

2.1.7 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 hepatectomia 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 College para el FHF (O'Grady y cols., 1989) sean capaces de lograr una estimación acertada de

prognosis. Sin embargo, hasta la fecha ninguno de los modelos desarrollados cumple estas premisas. Además los criterios clínicos y bioquímicos utilizados para indicar la existencia 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 y que 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 estandarizarle. Además, la muerte debe producirse por fallo hepático, 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 menor riesgo para las personas involucradas en los estudios (Terblanche y Hickman, 1991).

2.1.7.1 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.

2.1.7.1.1 Hepatectomía total y parcial

Los modelos quirúrgicos de eliminación total y/o parcial del hígado se han desarrollado con éxito en diversas especies animales después del primer intento realizado en perros (Mann, 1921). En cerdos se describió un modelo potencialmente reversible, que combina la hepatectomia parcial (HP) (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 (Filipponi y cols., 1991, Fukueda y cols., 2006).

Se ha podido establecer en ratas que una resección del 95% del hígado es un buen modelo de FHF (He y cols., 2003) mientras que en ratones una hepatectomía de menos del 90% es el límite de seguridad como modelo de estudio de regeneración hepática, ya que por encima de dicho valor se encuentra en un nivel de fallo hepático mortal (Makino y cols., 2005).

La hepatectomía total del hígado presenta los inconvenientes de la ausencia de productos derivados de la necrosis hepática y transmisores de señales fundamentales en el mecanismo patogénico del fallo hepático. Por otro lado, sus ventajas se limitan a la reproductibilidad y a su utilidad para el estudio de diversos soportes artificiales *in vivo* en ausencia de los productos tóxicos eliminados o producidos por el hígado dañado. A pesar de los inconvenientes reseñados la hepatectomía se ha utilizado en ratas para estudios de regeneración hepática (Eguchi y cols., 1996; 1997) y en cerdos como modelo reproducible para comprobar la eficacia y función de diversos sistemas temporales de soportes hepáticos (Tuñón y cols., 2007).

Se ha podido demostrar en ratas sometidas a diversos grados de HP, mediante el análisis de ADN, que el FHF inducido es consecuencia tanto del incremento de la apoptosis como de la disminución de la regeneración hepática (Morita y cols., 2002).

2.1.7.1.2 Desvascularización

La desvascularización completa del hígado se ha utilizado con éxito para inducir un fallo hepático reproducible en cerdos que pueda ser utilizable para el estudio de diversos sistemas de soportes hepáticos artificiales y/o bioartificiales (Sen y cols., 2006) o para la constatación del efecto de sustancias antioxidantes tales como la N-acetilcisteína (Ytrebo y cols., 2001).

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 fallo hepático mediante la isquemia del órgano por derivación portocava y ligadura de la arteria hepática (Nakazawa y cols., 2002) o mediante desvascularización total (Ytrebo y cols., 2001).

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, así como un modelo porcino en el que se combina una resección del 75-80% del hígado después de un periodo de isquemia (Ladurner y cols., 2005).

En estudios realizados sobre 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 HP 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).

2.1.7.2 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 EH y el edema cerebral del FHF del hombre. A pesar de ello las sustancias químicas hepatotóxicas se han utilizado y se usan con frecuencia como modelo de FHF.

El acetaminofeno (paracetamol) es un fármaco de uso común que puede causar daño hepático. Recientes estudios proponen que la apoptosis juega un papel clave en la inducción de fallo hepático por acetaminofeno (Ferret y cols., 2001). Sin embargo, los resultados de numerosos estudios en modelos animales en los que se utiliza el acetaminofeno para inducir fallo hepático agudo reflejan resultados no muy homogéneos debido a la existencia de importantes variaciones en el metabolismo hepático de destoxificación del fármaco relacionadas con la especie y con la edad (Rahman y cols., 2002). Otros aspectos importantes, que no se han estandarizado en estos modelos y que conllevan 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, que 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 (Newsome y cols., 2000). Los resultados obtenidos no son muy homogéneos, el intervalo entre el daño infringido a los animales y la muerte presenta muy poca uniformidad, es un producto caro para emplearlo en grandes animales y finalmente carece de inocuidad (Rahman y Hodgson, 2000).

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

2.1.7.3 Modelos víricos

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

Nuestro grupo ha descrito un modelo animal de FHF producido por la infección experimental de conejos con el 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. 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 enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y del TNF- α (Sánchez-Campos y cols., 2004) al igual que se ha descrito en pacientes con FHF (Muto y cols., 1988). El TNF- α es un agente que puede conducir tanto a la proliferación celular como la apoptosis; su sobreexpresión se relaciona tanto con el índice de apoptosis en el FHF como con la regeneración hepática (Webber y cols., 1998). Por tanto, el conjunto de análisis y observaciones recogidas en los animales infectados por el RHDV refuerza su posible utilización para el estudio de la patogénesis y el tratamiento del FHF, puesto que cumple la mayoría de los requisitos para ser considerado un buen modelo de FHF (Belanger y Butterworth, 2005; Abrantes y cols., 2012).

2.1.8 La enfermedad hemorrágica del conejo como modelo de fallo hepático fulminante

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

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

Alemania. El agente que provoca la enfermedad se inscribe en el género *Lagovirus* de la familia *Caliciviridae* (Ohlinger y cols., 1990; Meyers y cols., 1991); dicho virus no se replica en ningún otro vertebrado (Gould y cols., 1997), y no se ha señalado hasta la fecha su transmisión al hombre, aún entre las poblaciones más expuestas al virus.

La RHD se caracteriza por una alta morbilidad y una mortalidad cercana al 95% en los animales adultos, mientras que los gazapos menores de 8 semanas de edad son resistentes a la infección (Xu y Chen, 1989). Los conejos mueren en un rango de tiempo definido, entre las 36 y las 54 horas postinfección (pi) con signos clínicos característicos de un FHF progresivo y coma.

2.1.8.1 Etiología

Después de años de etiología confusa, el virus responsable de la RHD (RHDV) ha sido clasificado como un miembro del género *Lagovirus*, dentro de la familia *Caliciviridae* (Parra y Prieto 1990; Ohlinger y cols., 1990; 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, que produce síntomas muy 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 solo se conoce un serotipo con dos 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; Abrantes y cols., 2012) (Figura 3). Es estable en el medio ambiente, donde se disemina con facilidad. 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 o el agua.



Figura 3. Estructura del RHDV.

2.1.8.2 Patogenia

Tras la infección, el primer órgano en el que se detecta el virus es el hígado en el que origina una hepatitis primaria de naturaleza fulminante caracterizada por necrosis focal. Asimismo, se produce daño en el endotelio vascular que origina la puesta en marcha de los mecanismos de la coagulación para su reparación así como de fibrinolisis, provocando el desarrollo de una CID, 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 es secundario a la gran disminución en la síntesis de los factores de la coagulación en su forma inactiva como consecuencia de la grave afectación hepática (Duff y cols., 1994). Este hecho es característico de ciertas formas de hepatitis ("hepatitis fulminantes") humanas (hepatitis A, B y E). De hecho, tanto en la RHD como en el hombre con hepatitis E se presenta con frecuencia una CID que se ha atribuido a la intervención secundaria de endotoxinas bacterianas después de la afectación vírica de los hepatocitos (Navascués y cols., 1994). Entre las lesiones más características se observa una necrosis con acumulación de pigmentos y de hemosiderina en las células de Kupffer, lesiones que son comparables a las observadas en las hepatitis A, B y E en el hombre (Carman y cols., 1998).

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

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

Se ha descrito que en esta patología existe un proceso de muerte celular programada, y que la apoptosis es una constante en los animales infectados con el virus de la RHD (Jung y cols., 2000; San Miguel y cols., 2006). El fenómeno afecta principalmente a los hepatocitos, pero también presentan signos típicos de apoptosis los macrófagos y las células endoteliales (Alonso y cols., 1998). La apoptosis de los hepatocitos produce una destrucción parenquimatosa extensa que causa una hepatitis fulminante 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 por el virus de la

enfermedad hemorrágica desde las 40 hpi, si bien se ve incrementada a partir de las 70 hpi en conejos que mueren espontáneamente (Alonso y cols., 1998).

2.1.8.3 Cuadro clínico

La enfermedad puede evolucionar de forma sobreaguda, aguda, subaguda o crónica. La forma de presentación más frecuente es la aguda. En un brote, entre un 5 a 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 EH. 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.

2.1.8.4 Lesiones

2.1.8.4.1 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.

2.1.8.4.2 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., 1991). Se constata asimismo, la presencia de pequeños focos diseminados de hemorragias intralobulares.

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

2.2 Mecanismos moleculares del FHF

2.2.1 Estrés oxidativo

El oxígeno es un elemento imprescindible para la vida, pero solo el 95% del que consumimos sigue la ruta fisiológica en condiciones normales, el resto experimenta sucesivas reducciones donde se generan moléculas altamente tóxicas denominadas especies reactivas del oxígeno (EROs). En condiciones normales el oxígeno se encuentra en su forma más estable, O₂; en esta forma es poco reactivo, con una velocidad de reacción a temperatura fisiológica baja. Sin embargo, por reacciones puramente químicas, o acciones enzimáticas o por efecto de radiaciones ionizantes se pueden producir una serie de especies reactivas, prooxidantes o RL (altamente reactivos) que son capaces de dar lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo y producir daño celular (Halliwell, 2000).

Bajo condiciones fisiológicas estos RL se generan en un 15, 45, 35 y 5% en las mitocondrias, microsomas, peroxisomas y compartimento citosólico, respectivamente (Chance y cols., 1979). Aunque en las mitocondrias hepáticas se genera aproximadamente el 15% de los RL, esta cantidad es pequeña comparada con la cantidad de oxígeno utilizado en este orgánulo, lo cual indica la presencia de un potente mecanismo que inhibe la formación de dichos radicales. Los radicales superóxido (O_2) se forman predominantemente en el complejo I y en el complejo III de la cadena respiratoria (Turrens y cols., 1985). El término EROs es un término colectivo que incluye RL y ciertas especies no radicales que son oxidantes y/o se convierten fácilmente en RL.

El equilibrio oxidativo del organismo humano es esencial para la regulación metabólica, la producción de energía, la activación o inactivación de moléculas, la transducción de señales, el recambio celular y el control del tono vascular entre otros. Si este balance entre los sistemas oxidantes y los antioxidantes se desequilibran a favor de los primeros, por la producción excesiva de EROs y de especies reactivas del nitrógeno, junto con el debilitamiento de los sistemas antioxidantes induce una situación conocida como estrés oxidativo (Slater, 1984).

Un RL es una molécula o un fragmento de una molécula que contiene uno o más electrones desapareados en un orbital externo (Pryor, 1986), dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad. Esta inestabilidad lo hace extraordinariamente reactivo y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos, con una gran diversidad de moléculas integrantes de estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos (Gutteridge y Halliwell, 1989).



Figura 4. Estrés oxidativo causado por los radicales libres.

El daño celular que pueden causar los RL se traduce en peroxidación lipídica, inactivación enzimática, alteraciones del estado de oxido-reducción intracelular y daño en el ADN (Slater y cols., 1987) (Figura 4). Ante la presencia de RL, el organismo debe neutralizarlos y defenderse, para así evitar la lesión de los tejidos. El problema aparece cuando la concentración de estos RL es muy elevada, ya que si se encuentran presentes en el organismo en cantidades adecuadas aportan algunos beneficios tales como: la lucha contra bacterias y virus, regulación de la estructura y función de las proteínas, o el control del tono muscular (Ji, 1993).

2.2.2 Defensas antioxidantes

Las células de los mamíferos poseen sistemas de defensa antioxidante, tanto de naturaleza enzimática como no enzimática, para hacer frente a los RL. Esta defensa antioxidante incluye a varios componentes, tanto endógenos como exógenos en origen, que funcionan de forma interactiva y sinérgica para neutralizar los RL (Jacob y Burri, 1996).

- a) Actividades superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión-S-transferasa (GST) que catalizan reacciones de neutralización de RL.
- b) Proteínas y péptidos que se unen a metales pesados, como la ferritina, lactoferrina, albúmina y ceruloplasmina, que secuestran al hierro libre y al cobre, los cuales son capaces de catalizar reacciones de oxidación. El tripéptido glutatión es el principal compuesto no enzimático de defensa antioxidante.
- c) Antioxidantes derivados de nutrientes como el ácido ascórbico (vitamina C), tocoferoles y tocotrienoles (vitamina E), carotenoides y otros compuestos de bajo peso molecular como el ácido lipoico. La vitamina C es considerada como el antioxidante hidrosoluble más importante de los líquidos extracelulares y es capaz de neutralizar las EROs en la fase acuosa antes de que éstas inicien la peroxidación lipídica. La vitamina E, es el mayor antioxidante liposoluble, siendo realmente efectivo en la protección de las membranas celulares. Los betacarotenos y otros carotenoides, también aportan protección antioxidante en tejidos ricos en lípidos, actuando de forma sinérgica junto a la vitamina E.
- Numerosos fitonutrientes antioxidantes presentes en una amplia variedad de comidas vegetales, como son los flavonoides.

2.2.2.1 Glutatión

El glutatión es el compuesto tiol no proteico más abundante de las células de mamíferos, microorganismos y de la mayoría de las plantas. Es un
tripéptido (L-y-glutamil-L-cisteinil-glicina) con dos aminoácidos, glutamato y glicina, los cuales determinan su disposición, y otro aminoácido, la cisteína que es responsable de sus funciones. El glutatión está presente en casi todas las células de los animales, aunque predominantemente en el tejido hepático (Hammond v cols., 2001). Su molécula posee dos características fundamentales: por un lado un enlace y-glutamilo y por otro un grupo tiol (SH), grupo que lo hace extraordinariamente reactivo para las sustancias tóxicas, o no, naturales o exógenas a la célula e incluso consigo mismo (Meister y Anderson, 1983). Puede encontrarse en dos formas según su estado de óxidoreducción: como GSH o glutatión reducido, o como GSSG o glutatión oxidado. El GSH desempeña numerosas e importantes funciones metabólicas, una de ellas es la de proteger a la célula contra los RL, los peróxidos y otros compuestos tóxicos, así como proteger frente al efecto nocivo de las radiaciones. El GSH puede reaccionar directamente con los RL, sin necesidad de intervención enzimática, o bien por medio de la GPx, enzima clave del ciclo redox del glutatión. Cuando se produce una agresión oxidativa, el GSH se oxida a GSSG por medio de la reacción catalizada por la GPx. El GSSG formado es inmediatamente reducido a GSH por medio de la enzima GR. La GR requiere NADPH como cofactor, que será suministrado por la glucosa-6fosfatodeshidrogenasa (Figura 5). Tanto la GPx como la GR se hallan predominantemente en el citosol, existiendo también cierta actividad en la mitocondria.



Figura 5. Ciclo de oxido-reducción del glutatión.

Las células eucariotas tienen cuatro reservorios principales de glutatión. Casi el 90% del GSH celular se encuentra en el citosol, el 10% en la mitocondria y un pequeño porcentaje en el retículo endoplásmico y en el núcleo (Lu, 1999; Masella y cols., 2005).

El GSH es sintetizado a partir de L-glutamato, L-cisteína y L-arginina por la acción consecutiva de la γ-glutamilcisteína sintetasa (γ-GCS) y la glutatión sintetasa en dos reacciones dependientes de ATP (Huang y cols., 1988; Lu, 1999). Si bien el glutatión es sintetizado en el interior de la célula, su degradación tiene lugar fuera de la misma. Las enzimas responsables de la degradación del GSH son la glutamiltranspeptidasa (γ-GT) y diversas peptidasas, que son proteínas unidas a la membrana que se localizan en la superficie apical de las células epiteliales. Tras el catabolismo del glutatión se forman los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina, que pueden ser reabsorbidos al interior de la célula para volver a sintetizar GSH (Paolicchi y cols., 2002; Lu, 2009).

Cuando un tejido se expone a una gran cantidad de RL, puede no ser capaz de mantener la relación entre ambas formas de glutatión y se acumula el GSSG. Esto provoca una alteración del estado de óxido-reducción intracelular, inactivación de enzimas que poseen uno o más grupos SH en sus sitios activos y la formación de enlaces disulfuro inter o intramoleculares (Lieber y cols., 1990). En determinadas circunstancias, la capacidad para reducir el GSSG puede estar disminuida, acumulándose éste en el interior de la célula, por lo que se activan los sistemas de transporte para su expulsión (Lauterburg y cols., 1984).

El GSH es el principal tiol intracelular antioxidante, y como tal, participa en un gran número de funciones defensivas. Ahora bien, tiene además otras funciones:

1) La destoxificación de xenobióticos (como el bromobenceno o el acetaminofeno) o sus metabolitos. Estos compuestos son electrófilos y forman

46

conjugados con el GSH de forma espontánea o mediante la acción de la enzima GST. Los conjugados formados son excretados desde la célula y, en el caso de los hepatocitos, a la bilis (Dickinson y Forman, 2002a).

 El GSH interviene en el mantenimiento del estado tiol de las proteínas para evitar la oxidación de los grupos SH (Dickinson y Forman, 2002a).

El equilibrio GSSG/GSH regula un gran número de procesos metabólicos celulares que incluyen la actividad de diversas enzimas, actividades de transporte, y de expresión de genes mediante la alteración de los factores de transcripción (Dickinson y Forman, 2002b).

3) El H_2O_2 endógeno es reducido por el GSH en presencia de la GPx dependiente de selenio. Como resultado, el GSH es oxidado a GSSG, que es a su vez reducido a GSH por la GR a expensas de NADPH, formando un ciclo de óxido-reducción. Tanto la GPx como la GST pueden reducir peróxidos orgánicos. El H_2O_2 también puede ser reducido por la CAT, que está presente en los peroxisomas (Mates y cols., 1999).

4) Una de las funciones más importantes del glutatión es la de servir de almacenamiento de la cisteína, ya que este aminoácido es extremadamente inestable fuera de la célula y de forma rápida se autooxida a cistina, en un proceso con potencial formación de EROs. El ciclo del γ-glutamilo, permite que el GSH sirva como una fuente continua de cisteína (Orlowski y Meister., 1970).

5) Son también funciones importantes del GSH, la modulación de procesos celulares fundamentales como la síntesis de ADN, mecanismos relacionados con los microtúbulos y funciones inmunológicas (Dickinson y Forman, 2002b); y también interviene en la espermatogénesis y la maduración de los espermatozoides (Sies, 1999).

 El GSH es esencial para la conversión catalizada por la endoperóxido isomerasa, de prostaglandina H2 a prostaglandinas D2 y E2 (Lu, 1999).

2.2.2.2 El factor Nrf2 y las enzimas antioxidantes

El factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas destoxificantes y antioxidantes, mediante su unión a una secuencia específica del ADN conocida como elemento de respuesta antioxidante (ARE, de sus siglas en inglés: "Antioxidant Response Element"), que puede ser activada por diversos compuestos oxidantes y/o electrófilos de naturaleza química muy diversa (Li y Kong, 2009). En condiciones normales el Nrf2 se encuentra en el citosol inhibido por la proteína represora-1 asociada a ECH (Keap1), dicha unión fomenta la permanente degradación de Nrf2 por el proteosoma (Sun y cols., 2007). Se ha sugerido que el sistema Nrf2-Keap1 contribuye a la protección contra varias patologías como el cáncer, la toxicidad hepática y la inflamación entre otras (Sriram y cols., 2009; Sugimoto y cols., 2010).



Figura 6. Vía de señalización del factor de transcripción Nrf2.

La actividad del Nrf2 puede ser modulada también por modificaciones post-traduccionales, como pueden ser fosforilaciones en serinas y treoninas por diversas quinasas como PI3K, PKC, JNK y ERK, fosforilaciones que parecen facilitar la disociación del complejo Nrf2-Keap1 (Figura 6).

2.2.2.3 Importancia del estrés oxidativo en el FHF

El estrés oxidativo está implicado en la patogenia de un gran número de enfermedades hepáticas como las hepatitis víricas o la toxicidad inducida por drogas. Existen evidencias en modelos animales que ponen de manifiesto la implicación del estrés oxidativo y de los RL en patofisiología del FHF (Bernal y cols., 2010). Los propios hepatocitos que mueren pueden ser una fuente de estrés oxidativo, aumentando tanto la apoptosis como la necrosis de más hepatocitos y resultando en un círculo vicioso. La sobreproducción de EROs junto con una disminución de las defensas antioxidantes contribuyen al desarrollo y la progresión del FHF (San Miguel y cols., 2006).

Además, el hígado contiene las concentraciones de GSH más importantes del organismo y es único en dos aspectos en lo que se refiere a la síntesis de GSH (DeLeve y Kaplowitz., 1990; 1991). En primer lugar, el hepatocito es el único capaz de convertir la metionina en cisteína a través de la vía de la transulfuración, y en segundo lugar, la tasa de biosíntesis de GSH en el hepatocito está regulada por su tasa de transporte al plasma, la bilis y la mitocondria por medio de diferentes sistemas transportadores (Sies y cols., 1978; Ookhtens y Kaplowitz, 1998).

2.2.3 La inflamación

La inflamación es un mecanismo homeostático que se desencadena ante una agresión en un tejido vascularizado. Tiene como finalidad la reparación de la lesión tisular y la eliminación de las células y tejidos necróticos (Bataller y Brenner, 2005). La inflamación es pues un proceso clave en la progresión de diversas enfermedades como el cáncer, el asma, la enfermedad inflamatoria intestinal o las enfermedades hepáticas crónicas.

La inflamación está dirigida por mediadores bioquímicos que pueden circular en el plasma (mediadores sistémicos o plasmáticos) o pueden ser producidos en el propio tejido afectado (mediadores locales) (Bataller y Brenner, 2005). En las enfermedades hepáticas, los primeros son sintetizados por el hígado y necesitan ser activados para ejercer su función y los segundos pueden estar preformados y almacenados en gránulos dentro de las células (especialmente mastocitos, basófilos o neutrófilos) o sintetizados *de novo*.

En su conjunto, los mediadores de la inflamación son responsables de los cambios locales que se producen en el tejido inflamado. Su función es la de facilitar la entrada de células inflamatorias al foco de la lesión y la entrada de proteínas plasmáticas al tejido dañado. Dichos mediadores promueven mecanismos específicos como la vasodilatación, el aumento de la permeabilidad vascular, el incremento de la viscosidad de la sangre, la quimiotaxis y la transmigración de células inflamatorias.

Las citoquinas son unos de los mediadores clave de la inflamación. Además de modular la respuesta inflamatoria, tienen la capacidad de regular otros procesos biológicos como la muerte celular, la angiogénesis, la fibrosis y la regeneración tisular. Las citoquinas son un extenso grupo de proteínas formado por varias familias: interleucinas (IL), interferones (IFN), miembros de la familia del TNF, quimiocinas y factores de crecimiento (Bataller y cols., 2000) (Figura 7). Las citoquinas pueden ser proinflamatorias (como la IL-1 o el TNF- α) o antiinflamatorias (como la IL-4 o la IL-10). Las citoquinas modulan la respuesta inflamatoria local a la vez que pueden ejercer efectos sistémicos como la inhibición del apetito o la fiebre (Bataller y cols., 2003; Bataller y Brenner, 2005).



Figura 7. Grupos de citoquinas proinflamatorias.

2.2.3.1 La inflamación hepática

Debido a su función y situación anatómica, el hígado está constantemente expuesto a agresiones que pueden inducir inflamación. Es por ello que ha desarrollado numerosos mecanismos de defensa como la presencia de una elevado número de macrófagos residentes (células de Kupffer) (Saile y Ramadori, 2007), una elevada concentración de moléculas antioxidantes como el glutatión (Schuppan y cols., 2003; Reuben, 2008) y una alta capacidad de regeneración (Marra y cols., 2005). Ante ciertas agresiones, estos mecanismos de defensa pueden ser insuficientes, lo que conduciría a un aumento de la muerte de los hepatocitos y la consiguiente respuesta inflamatoria (Pinzani y Marra, 2001).

La inflamación es un hallazgo común en la mayoría de enfermedades crónicas del hígado. Las causas más frecuentes de inflamación hepática en España son la infección por VHC y el consumo excesivo de alcohol (Bataller y cols., 2005), aunque existen otras causas (Tabla 1).

Etiología	Ejemplos
Vírica	Virus de la hepatitis: A, B, C, D y E
	Otros virus hepatotropos (Epstein-Barr, varicela-zóster, citomegalovirus, etc)
Tóxica	Consumo abusivo de alcohol
	Fármacos (paracetamol, metotrexato, anestésicos, etc)
	Abuso de drogas
Inmunitaria	Hepatitis autoinmune
	Rechazo de hígado trasplantado
Genética	Enfermedad de Wilson
	Hemocromatosis
	Glucogenosis
Alteraciones biliares	Obstrucción del conducto biliar
	Cirrosis biliar primaria
Bacteriana	Fiebre tifoidea
	Tuberculosis
Parasitaria	Esquistosomiasis
Alteraciones circulatorias	Hepatitis isquémica
Nutricional	Obesidad (esteatohepatitis no alcohólica, NASH)

 Tabla 1. Diferentes etiologías de la inflamación hepática.

El pronóstico de la inflamación hepática es muy diferente según la etiología. La inflamación se denomina aguda si se resuelve en un corto periodo de tiempo, y crónica si se mantiene durante años. Dentro de la hepatitis aguda, ésta se puede clasificar en autolimitada y grave. La infección por VHA es un ejemplo de hepatitis aguda autolimitada, ya que generalmente se resuelve

rápidamente y no suele presentar complicaciones clínicas. Sin embargo, la inflamación aguda producida por algunos tóxicos o por el VHB, pude dar lugar a una hepatitis grave y asociarse a insuficiencia hepática (Bataller y cols., 2003).

Cuando la hepatitis se cronifica suele desarrollarse fibrosis, que consiste en el acúmulo de matriz extracelular (MEC), principalmente colágeno. Esta puede evolucionar hasta cirrosis en algunos pacientes. La cirrosis implica un mayor riesgo de desarrollar cáncer hepatocelular.

Las células involucradas en la respuesta inflamatoria del hígado se pueden clasificar en dos grupos: células residentes en el hígado (principalmente hepatocitos, células estrelladas (HSC), células endoteliales y células de Kupffer) y células circulantes del sistema inmunitario que infiltran el hígado.

La respuesta inflamatoria del hígado suele iniciarse cuando los hepatocitos son dañados. Estos participan en la inflamación liberando citoquinas y EROs. Estos primeros mediadores inflamatorios, la muerte de los hepatocitos y las propias moléculas causantes del daño, inducen la activación del resto de células hepáticas y el reclutamiento de leucocitos del torrente sanguíneo. El papel de las células endoteliales en la inflamación hepática consiste en incrementar la expresión de quimiocinas que promueven la atracción y migración de leucocitos del torrente sanguíneo (Eng y Friedman, 2001). Las moléculas que participan en la activación de las HSC derivan principalmente de las células de Kupffer y del infiltrado inflamatorio. La activación de las HSC consiste en un cambio fenotípico que se asocia a la adquisición de funciones profibrogénicas y proinflamatorias. Aunque estas células son especialmente importantes en el proceso de fibrogénesis hepática, también juegan un papel importante en el inicio del daño hepático, ya que secretan diversos mediadores inflamatorios y expresan moléculas de adhesión

(Eng y Friedman, 2001). De manera similar las células de Kupffer activadas secretan mediadores inflamatorios como EROs, citoquinas y eicosanoides.

Como se ha explicado anteriormente, las células del sistema inmunitario también juegan un papel importante en la inflamación hepática. El sistema inmunitario se divide en dos: innato y adaptativo. La inmunidad innata es la respuesta rápida, inicial y no específica a estímulos dañinos (patógenos, estrés oxidativo, células malignas). El sistema inmunitario adaptativo es la respuesta tardía (necesita días para su activación) y específica contra un antígeno determinado (Bataller y cols., 2003).

Ante una lesión en el hígado algunas células circulantes del sistema inmunitario son atraídas hacia el foco de la inflamación mediante los mediadores quimioatrayentes. De manera simplificada, las células del sistema inmunitario participan en la inflamación mediante la secreción de citoquinas (linfocitos, células NK y macrófagos), la producción de sustancias citotóxicas (neutrófilos), la presentación de antígenos (macrófagos y células dendríticas), la inducción de apoptosis en células infectadas (células NK y linfocitos T), la fagocitosis (neutrófilos, macrófagos y células dendríticas) y la producción de anticuerpos (linfocitos B). La etiología de la enfermedad hepática y el tipo de inflamación (aguda o crónica) determina el tipo celular más importante en el infiltrado inflamatorio, por ejemplo en las hepatitis agudas es muy importante el infiltrado de células polimorfonucleares (básicamente neutrófilos), mientras que los linfocitos son mucho más abundantes en las hepatitis virales (Marqués y cols., 2012).

2.2.3.2 Importancia de la inflamación en el FHF

Los mecanismos responsables del daño hepático en las hepatitis víricas que conducen al FHF son complejas e incluyen el efecto citopático del virus y una vigorosa respuesta inflamatoria, resultando en un daño hepatocelular que supera la capacidad del hígado para regenerarse (Tuñón y cols., 2011). Muchos factores de crecimiento, citoquinas, factores de transcripción, y vías de señalización intracelular han sido implicados en la regulación del daño hepático y su regeneración (Bernal y cols., 2010). Sin embargo, aunque algunos enfoques terapéuticos para el FHF han intentado bloquear la respuesta inflamatoria y mejorar a las vías de proliferación (Harrison y cols., 1990), todavía son necesarias terapias capaces de atenuar el daño de los hepatocitos y estimular la regeneración.

Una gran variedad de moléculas liberadas por las células necróticas han sido identificadas como posibles inductores de la formación de citoquinas a través de la estimulación de los receptores tipo toll (TLRs). Entre estas moléculas se incluye la proteína del grupo de alta movilidad Box1 (HMGB-1), las proteínas de choque térmico, y fragmentos de ADN (Yang y cols., 2010; Kang y cols., 2011).

Las citoquinas desempeñan un papel fundamental en los procesos inflamatorios, pues sirven de intermediarias en el control y regulación de los estados proinflamatorios y antiinflamatorios, en dependencia de los procesos desencadenantes. Muchas citoquinas han sido implicadas en el estado inflamatorio local y sistémico observado en el FHF, pero las principales investigaciones enfatizan el papel que desempeñan la IL-6, la IL-1β y el TNF (Nguyen y Veirling, 2011).

2.2.4 La apoptosis

La apoptosis es un proceso activo de muerte celular descrito por primera vez en Grecia para indicar un deterioro en la función celular. En el hígado este fenómeno fue descrito por Kerr durante un estudio en el cual relató la atrofia del órgano después de la ligadura de la vena porta (Kerr y cols, 1972).

En 1972 los investigadores Kerr, Willie y Currie observaron un modo de muerte celular en el que las células morían de una forma morfológicamente diferente a la muerte por necrosis, ya que se producían una serie de cambios secuenciales que no tenían como resultado la pérdida de integridad de la membrana celular y que, además, no desencadenaban una respuesta inflamatoria, tal y como ocurría en la muerte por necrosis (Kerr y cols., 1972).

En el proceso de muerte por necrosis la célula se caracteriza por incrementar su tamaño, los orgánulos celulares se desorganizan y la mitocondria se hincha, mientras que la membrana mitocondrial interna se contrae, la cromatina aparece dispersa y finalmente la membrana celular se rompe liberando todo el contenido celular y moléculas proinflamatorias que desencadenan una respuesta inmune (Figura 8).



Figura 8. Diferencias entre la muerte celular por apoptosis y por necrosis.

Sin embargo, a pesar de que la apoptosis y la necrosis se consideran entidades totalmente distintas, un nuevo punto de vista está emergiendo y se considera que ambos procesos son con frecuencia la 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. La apoptosis contribuye a la prevención de la replicación, diseminación y persistencia de los virus (Ghavami y cols., 2005; Fischer y cols., 2007).

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

- Las células se encogen y pierden contacto con las células vecinas. Esto es provocado por el movimiento de fluidos fuera de la célula debido a la inhibición del sistema de transporte Na⁺-K⁺-Cl⁻.
- Las cisternas del retículo endoplasmático liso (REL) se dilatan y pueden fusionarse con la membrana plasmática, pero el resto de orgánulos celulares permanecen intactos. También hay una gran activación de las transglutaminasas.
- La célula se vuelve reconocible por macrófagos, ya que la fosfatidilserina pasa de la cara interna de la membrana plasmática al exterior.
- La cromatina se condensa y se acumula en la periferia del núcleo.
- Las endonucleasas rompen el ADN en fragmentos oligonucleosomales de unos 180-200 pares de bases (pb).
- La membrana adquiere una apariencia vesicular característica y aparece el denominado "blebbing" (protuberancias o burbujas en la superficie celular).
- Como resultado de las grandes invaginaciones aparecen los cuerpos apoptóticos. Estos tienen la membrana intacta y pueden ser reconocidos por macrófagos y ser fagocitados.

Los cambios bioquímicos son más precoces y no completamente conocidos. El primer cambio detectado es una modificación en el potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi$ m) que origina translocación y liberación del

citocromo c (Cit-c) al citoplasma celular, también se produce una redistribución de los lípidos de la membrana así como la activación de proteasas intracelulares (caspasas).

Antes de descubrir el proceso apoptótico se pensaba que los procesos de senescencia, diferenciación y proliferación controlaban la población celular. El descubrimiento de que la apoptosis es un proceso activo, implica también que es un proceso regulado (Wyllie y cols., 1984; McConkey y cols., 1989).

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

2.2.4.1 Vías de la apoptosis

Existen dos vías de activación de apoptosis, una es la ruta intrínseca o mitocondrial, inducida por distintas formas de estrés y la ruta extrínseca o de receptores de muerte, disparada por la activación de los miembros de la superfamilia de receptores del TNF en la superficie celular. Por cualquiera de las dos rutas, la activación de las caspasas iniciadoras se produce a través de la formación de un complejo proteico inicial, en el cual se reclutan caspasas iniciadoras que se autoactivan por aproximación.

En la vía intrínseca la mitocondria juega un papel fundamental inducido por varios estímulos. Numerosas moléculas señalizadoras de la apoptosis, así como estímulos patológicos convergen en la mitocondria induciendo la permeabilidad de su membrana externa y la liberación de proteínas que normalmente se encuentran en el espacio intermembrana de la mitocondria. Entre estos factores podemos destacar el Cit-c o el factor inductor de apoptosis (Kluck y cols., 1997; Susin y cols. 1999). Un segundo mecanismo es la generación de un cambio en el potencial transmembrana de la membrana interna mitocondrial, lo que provoca la apertura de canales en la membrana mitocondrial externa permitiendo la salida de proteínas intermembrana (Green y Reed, 1998; Chang y Yang, 2000). La liberación de estos factores está a su vez regulada por la familia de proteínas del gen 2 del linfoma de células B (Bcl-2) (Green y Reed, 1998; Willis y cols., 2003). En cualquier caso, estas variaciones en la membrana mitocondrial precipitan la muerte celular a través de al menos tres mecanismos: 1) desbaratamiento de la cadena de transporte de electrones, de la fosforilación oxidativa y de la producción de ATP (Eguchi y cols., 1997; Bossy-Wetzel y cols., 1998), 2) alteración del potencial de reducción-oxidación (redox) de la célula (Bredesen, 1995) y 3) liberación de proteínas del espacio intermembrana de la mitocondria al citosol, como el Cit-c, que una vez liberado se une a la proteína Apaf-1, permitiendo la unión del nucleótido dATP, de esta manera se forma el apoptosoma, que recluta y activa a la procaspasa 9, capaz de activar caspasas efectoras, como la caspasa 3 (Wang, 2001; Van Loo y cols., 2002).

La vía extrínseca se inicia por la implicación de alguno de los numerosos receptores de muerte situados en la superficie celular. Estos receptores de muerte pertenecen a la superfamilia de los receptores del TNF, y se caracterizan porque en la parte intracelular contienen un dominio de interacción con otras proteínas denominado dominio de muerte (Locksley y cols., 2001) que son activados por los ligandos de muerte. Los receptores de muerte mejor conocidos son el receptor de TNF de tipo 1 (TNFR1) y una proteína relacionada denominada Fas. Es una vía muy rápida y de escasa sofisticación basada en el reclutamiento de moléculas adaptadoras a través de sus dominio de muerte, 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 proteolisis a las caspasas ejecutoras o efectoras, tales como las caspasas 3 y 7. Esta vía de apoptosis puede inhibirse por una proteína

60

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).

2.2.4.2 Familia Bcl-2

De los genes implicados en la supervivencia celular de mamíferos, Bcl-2 fue el primero que se descubrió y por ello le da nombre a la familia (Reed, 1998). La familia Bcl-2 contiene tanto miembros antiapoptótcos (Bcl-2, Bcl-xL) como proapotóticos (Bax, Bad, Bik) y se encuentran localizados en la membrana externa mitocondrial, del RE y la nuclear (Green y Reed, 1998).

La familia Bcl-2 contiene cuatro dominios de homología llamados BH1, BH2, BH3 y BH4 (Reed, 1998; Lindenboim y cols., 2000). Según estos criterios la familia se divide en tres subfamilias:

- Subfamilia Bcl-2, compuesta por miembros antiapoptóticos, poseen los cuatro dominios de homología. Bcl-2, Bcl-xL y Bcl-w pertenecen a esta subfamilia.
- Sufamilia de Bax, son proteínas proapoptóticas y no tienen homología en el dominio BH4. Ejemplos son Bax y bak.
- Subfamilia con dominio único BH3, compuesta por miembros proapoptóticos, solo presentan homología BH3, como es el caso de Bid y Bik.

El dominio BH3 tiene carácter anfipático y es un dominio "crítico de muerte", presente en todos los miembros proapoptóticos y parece ser esencial para la heterodimerización de los miembros de la familia (Reed, 1998).

Los miembros de la familia Bcl-2 interactúan de una forma dinámica para regular la apoptosis. Los miembros proapoptóticos pueden heterodimerizar con miembros antiapoptóticos y bloquear su acción antiapoptótica. Por tanto, la relación en los niveles de expresión entre miembros antiapoptóticos/proapoptóticos determina si la célula va a sufrir apoptosis o no tras un estímulo apoptótico (Oltvai y Korsmeyer, 1994).

Los miembros de la familia Bcl-2 pueden tener localizaciones subcelulares diferentes, ya que mientras los miembros antiapoptóticos suelen estar como proteína integrales en las membranas del núcleo, RE y fundamentalmente la mitocondria, los proapoptóticos se encuentran en el citosol o asociados con el citoesqueleto (Hsu y cols., 1997; Puthalakath y cols., 1999). Cuando llega la señal apoptótica, los miembros proapoptóticos sufren un cambio conformacional que les permite integrarse también en la membrana (Wolter y cols., 1997; Antonsson y cols., 2001), lo que provoca la apertura de canales en la mitocondria que permiten la salida de factores proapotóticos de la misma (Figura 9).



Figura 9. Señalización de la familia de proteínas Bcl-2.

Los miembros de la familia Bcl-2 regulan la liberación de moléculas inductoras de apoptosis presentes en el espacio intermembrana, pero esta no es su única acción, ya que pueden actuar a diferentes niveles: a nivel mitocondrial, a nivel de caspasas (Pan y cols., 1998) y a nivel de las membranas del RE y del núcleo (Ng y cols., 1997).

2.2.4.3 Caspasas

Los cambios morfológicos observados en las células apoptóticas son iniciados por la activación de una serie de proteasas denominadas caspasas (Cryns y Yuan, 1998). Las caspasas fueron descritas por primera vez como miembros ejecutores de la apoptosis en estudios realizados sobre el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Shaham y Horvitz, 1996).

Estas enzimas están constitutivamente expresadas en las células como zimógenos (procaspasas) con ninguna o poca actividad (Thornberry y Lazenbik, 1998). Poseen una subunidad larga y una corta, y para ser activadas han de ser proteolizadas de forma secuencial en residuos de Asp. Las caspasas activas son tetrámeros formados por dos subunidades largas y dos cortas conteniendo así, dos sitios activos de catálisis (Wolf y Green, 1999).

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 enzime) 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 prodominio largo y estar involucradas en funciones de regulación de la activación de la cascada. Son las que primero se activan tras un estímulo apoptótico.
- 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 necesarios para la supervivencia de la célula, proteolizándolos.

2.2.4.4 Importancia de la apoptosis en el FHF

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 (Terada y Nakanuma, 1995; 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, si se sabe que la apoptosis esta involucrada en numerosas patologías hepáticas como son enfermedades hepáticas autoinmunes, hepatitis víricas crónicas, en procesos hepáticos asociados al consumo de alcohol, en procesos cancerígenos como en el hepatocarcinoma y el colangiocarcinoma (El Bassiouny y cols., 2008; Mauriz y cols., 2008), y en la patogénesis del FHF el cual se caracteriza por una incontrolada muerte masiva de hepatocitos (Leifeld y cols., 2006; Rutherford y Chung, 2008).

La apoptosis de los hepatocitos es el proceso más importante en el mecanismo molecular del fallo hepático (Eichhorst, 2005), porque 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 el inducido por galactosamina más LPS (Arvelo y cols., 2002), hepatitis por herpes simples (Hashimoto y cols., 2003), el modelo inducido por la concanavalina A (Trautwein y cols., 1998; Kim y cols., 2000) y también el modelo producido por el RHDV (San Miguel y cols., 2006).

2.2.5 Proteínas quinasas activadas por mitógenos

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) están implicadas en la diferenciación celular, proliferación, apoptosis y supervivencia celular. Todos sus miembros son activados por una cascada de fosforilación que empieza por una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), seguida de una MAPK quinasa (MAPKK) y finalmente, las MAPK se activan por una doble fosforilación en residuos de tirosina y treonina (Seger y Krebs, 1995; Qi y Elion, 2005).

La familia de las MAPK está formada por 5 grupos:

- 1) ERK 1 y 2
- 2) JNK 1, 2 y 3
- 3) Ρ38 α, β, γ y δ
- 4) ERK 3 y 4
- 5) ERK 5

La ERK1/2 se activa por factores de crecimiento, citoquinas y ésteres de forbol, y es un importante regulador de la proliferación celular, mientras que parece tener un papel menor en la apoptosis. Los principales objetivos de

ERK1/2 son otras quinasas, factores de transcripción, como el factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB), proteínas del citoesqueleto y Bcl-2.

La proteína quinasa N-terminal de c-Jun (JNK) se induce por varios tipos de estímulos de estrés, como radiación UV, citoquinas, estrés oxidativo o factores de crecimiento. La JNK participa en la respuesta a estrés, inflamación y apoptosis estimulando la transcripción y fosforilación de otras moléculas, que incluyen otras quinasas o proteínas moduladoras de la apoptosis.

Muchos de los estímulos que activan la JNK también activan la quinasa activada por mitógeno p38. La activación de p38 es crucial para la regulación del sistema inmune y la inflamación. Los objetivos de p38 son factores de transcripción, genes que codifican citoquinas proinflamatorias y quinasas. ERK 4 y 5 se activan por autofosforilación y ERK 5 es activado por factores de crecimiento, siendo esencial para la angiogénesis.

2.2.6 Regeneración hepática

La importancia del hígado en el organismo radica en su papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis metabólica. La amplia variedad de funciones realizadas por el hígado han sido preservadas a lo largo de la evolución al proporcionar a este órgano una extraordinaria capacidad regeneradora en respuesta a la pérdida de su propia masa, sin que con ello resulte afectada la viabilidad el organismo.

Aunque los hepatocitos adultos normalmente no se dividen, mantienen una gran capacidad proliferativa en respuesta a daño por agresión química, patógenos, xenobióticos y estrés inflamatorio. La capacidad de replicación de los hepatocitos en respuesta a estos daños hace posible la regeneración de la masa hepática incluso a partir de un bajo número de células (Sandgren y cols., 1991; Overturf y cols., 1997). El estudio detallado del proceso regenerativo ha sido abordado científicamente usando aproximaciones moleculares y genéticas (Saito y cols., 2010). El modelo más usado es la HP en hígado en rata aunque también se han desarrollado diferentes modelos farmacológicos, en este caso la pérdida hepática se produce por necrosis hepatocelular, unida a una respuesta inflamatoria, que precede a la respuesta regenerativa, y que permite investigar la interacción dinámica entre el daño hepático y la reparación celular (Díez-Fernández y cols., 1993; Rutherford y Chung, 2008).

En contraste con otros tejidos regenerativos, como la médula ósea o la piel, la regeneración hepática no depende de un grupo de células progenitoras o células madre. Aunque algunos estudios sugieren que las células madre de médulas ósea son capaces de diferenciarse a hepatocitos, no está claro si esto es un hecho poco habitual o que solo tiene lugar en respuesta a determinados tipos de daño (Petersen y cols., 1999; Minguet y cols., 2003). Estudios recientes también apuntan a que existen fusiones aisladas entre células madre de médula ósea y hepatocitos que pueden dar lugar a nuevas células de origen hepático (Vassilopoulos y cols., 2003; Fausto y Campbell, 2003).

La regeneración tras la HP se lleva a cabo por la proliferación de todas las poblaciones celulares maduras presentes en el órgano, aunque los hepatocitos son los primeros en proliferar. Los hepatocitos son células normalmente quiescentes en fase G_0 del ciclo celular y no se dividen (Michalopoulos y DeFrences, 1997; Fausto, 2000). Sin embargo, tras una HP se activan una serie de cascadas de señalización en el hígado y aproximadamente el 95% de los hepatocitos entran rápidamente en ciclo (Taub, 2004). La regeneración del hígado tras una HP es, técnicamente, un proceso de compensación mediante crecimiento más que una regeneración en sí, ya que los restos del hígado crecen en masa para compensar la pérdida del tejido.

El proceso de regeneración hepática se desarrolla en tres etapas: una fase de señalización temprana que pone en marcha la regeneración, una fase de proliferación celular (con mantenimiento de la función y estructura del hígado) y finalmente la parada de la respuesta proliferativa una vez que ha sido restituida la masa hepática adecuada.

Un gran número de genes están implicados en la regeneración hepática, pero el circuito esencial requerido para el proceso está constituido por tres redes principales que relacionan la función hepática con el crecimiento celular y la proliferación, e interactúan entre sí: citoquinas, factores de crecimiento y rutas metabólicas (Fausto y cols., 2006). Una importante unión entre citoquinas y factores de crecimiento puede ser la activación de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) por citoquinas como el TNF (Rudolph y cols., 1999; Kim y cols., 2000).

2.2.6.1 Señalización por citoquinas

Los factores de transcripción NF-κB, STAT-3, AP-1 y C/EBP-β se activan rápidamente tras la hepatectomía (Cressman y cols., 1995; FitzGerald y cols., 1995; Greenbaum y cols., 1998).

La activación de los factores de transcripción NF- κ B y STAT-3 inmediatamente tras la HP condujo a la hipótesis de que las citoquinas podían regular la respuesta regenerativa (Fausto, 2000) La señalización por TNF- α es requerida para la respuesta proliferativa como se ha demostrado con el uso de animales carentes del receptor 1 de TNF- α (TNF-R1 KO) (Yamada y cols., 1997).

Se piensa también que el TNF-α estimula la secreción de varias MMPs en enfermedades muy prevalentes. Las MMPs son una familia de proteasas dependientes de calcio y zinc que son capaces de degradar la MEC y la membrana basal permitiendo así la proliferación de hepatocitos. Las MMPs son importantes en la escisión y liberación de factores de crecimiento de la MEC. Específicamente, la pérdida de función del inhibidor tisular de metaloproteinasas 1 (TIMP-1), permite que aumente la actividad de MMPs tras la HP (Ohashi y cols., 2012).

La activación secuencial de las citoquinas y los receptores de factores de crecimiento puede estimular numerosas rutas de señalización intracelular necesarias para la supervivencia celular y la proliferación (Fausto y cols., 2006).

La carencia de STAT-3 resulta letal en estado embrionario y los animales carentes de STAT-3 selectivamente en hígado (Alb+ Stat-3-/-) presentan una recuperación retrasada tras la HP (Li y cols., 2002).

2.2.6.2 Señalización por factores de crecimiento

Además de la señalización por citoquinas, diversos factores de crecimiento participan en la replicación celular durante la regeneración hepática. Los efectos de los factores de crecimiento están mediados a través de sus receptores. Dos sistemas de señalización ligando-receptor participan en la regeneración hepática, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y su receptor c-Met, y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y sus ligandos y correceptores (Pedidditakis y cols., 2001; Huh y cols., 2004), entre otros. Cada día aumenta el interés por los resultados de estudios funcionales que estén dirigidos al conocimiento del papel y mecanismo de acción de estos factores de crecimiento y citoquinas en la regeneración hepática después del daño agudo del órgano (Böhm y cols., 2010).

El HGF es liberado por la MEC y actúa sobre los hepatocitos de forma paracrina. Tras ser sintetizado como pro-HGF es rápidamente activado por proteasas (Pediaditakis y cols., 2001; Shimizu y cols., 2001). El HGF regula varios procesos en el hígado, además de ser un estimulador directo de la proliferación hepática. Dado que la deleción del gen de HGF o de su receptor c-Met, conlleva letalidad en estado embrionario (Pediaditakis cols., 2001; Huh y cols., 2004) se han utilizado otros abordajes para el estudio de sus funciones *in vivo*. Estudios en ratones deficientes de c-Met en hígado han mostrado que la señalización a través de HGF-c-Met es importante para la síntesis de ADN y la regeneración tras una HP (Borowiak y cols., 2004) y tras un daño hepático (Huh y cols., 2004).

El HGF es un potente mitógeno para los hepatocitos en cultivo (Michalopoulos y cols., 1984; Gherardi y Stoker, 1990) y parte de sus efectos están mediados por la activación de otro factor de crecimiento, el TGF- α , que actúa tras unirse a su receptor, EGFR (Gherardi y Stoker, 1990). Los ligandos para EGFR incluyen al factor de crecimiento epidérmico (EGF), TGF- α , anfirregulina, HB-EGF, epirregulina y betacelulina.

La restauración de la histología normal del hígado requiere de la formación de una red vascular, necesaria para la provisión de los nutrientes para las distintas poblaciones celulares que presenta dicho órgano. La angiogénesis es un evento precisamente regulado durante la regeneración hepática. Las células endoteliales son estimuladas por una amplia gama de factores angiogénicos producidos por los hepatocitos durante la regeneración hepática. Dentro de estos podemos mencionar al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor más potente y mejor estudiado. El ARNm del VEGF se expresa, después de la HP, tanto en los hepatocitos como en las células hepáticas no parenquimatosas, sugiriendo que este factor de crecimiento juega un papel significativo en la regeneración hepática (Mochida y cols., 1996). Este último concepto también es apoyado por estudios en los que demostraron que el VEGF deriva tanto de las células parenquimatosas como de las no parenquimatosas del hígado de rata con procesos de necrosis (Ishikawa y cols., 1999).

70

Las plaquetas contienen factores de crecimiento incluyendo el HGF y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Después de una HP se produce una acumulación de plaquetas en los sinusoides hepáticos y un aumento en la proliferación de hepatocitos en periodos tempranos tras la hepatectomía. Las plaquetas contribuyen también en la progresión del ciclo celular además de prevenir el FHF (Myronovych y cols., 2008). Durante la remodelación tisular, el PDGF colabora en la ruptura del colágeno viejo mediante la activación de las MMPs (Jinnin y cols., 2005).

2.3 La melatonina

La glándula pineal o epífisis cerebral se conoce desde hace más de 2000 años, ya que fue descrita por primera vez por Serófilo de Alejandría (335-280 a.C.), quien afirmó que este órgano actuaba como *"un esfínter que controla el flujo de pensamientos"*. La descripción de la pineal y su situación anatómica realizada por Andrés Vesalio (1514-1564) en su obra *"De Humanis Corporis Fabrica"*, se considera una de las mejores; sin embargo, fue el polifacético René Descartes (1596-1650), quien en su libro *"De Homine"*, asignó a la glándula pineal el lugar donde reside el alma. Descartes pensó que los estímulos percibidos por los ojos eran llevados al cerebro y desde allí alcanzaban la glándula pineal.

A partir de la segunda mitad del siglo XIX se replanteó la fisiología de la glándula pineal. En 1850, Rudolph Albert von Kolliker (1817-1905) observó la presencia de fibras nerviosas en la glándula pineal de mamífero, y en 1904, Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) encontró fibras nerviosas ramificadas en la glándula pineal de ratón, y sugirió que eran de origen simpático.

A finales del siglo XIX, con el auge de la fisiología del sistema endocrino se sospechó que la glándula pineal de los mamíferos pudiera desempeñar un papel como glándula endocrina. Esta hipótesis se confirmó con la observación de casos clínicos de pubertad precoz en niños con tumores no parenquimatosos de la glándula pineal (Heubner, 1898).

Sin embargo, en toda la historia de la investigación de la glándula pineal, no hay ningún descubrimiento más importante que el de su principal hormona, la melatonina, una sustancia aislada por el dermatólogo Aaron Lerner (Lerner y cols, 1958). Estos autores observaron que dicha molécula aclaraba los melanocitos en la piel de anfibios, y le dieron el nombre de melatonina al relacionar su función con el pigmento melanina y su estructura con la serotonina.

Fue Axelrod en 1974 quien demostró que todos los pinealocitos poseen la maquinaria necesaria para la síntesis de melatonina (Axelrod, 1974). Histológicamente, la glándula pineal en los mamíferos está compuesta por dos tipos celulares integrados en folículos: la célula parenquimatosa o pinealocito, y la célula intersticial o astrocito inmaduro (Vollrath, 1985). La evolución filogenética funcional de la pineal se corresponde con una evolución citológica, de tal forma que, si en especies inferiores predomina el pinealocito como fotorreceptor, conforme nos acercamos a los mamíferos, las estructuras celulares evolucionan para capacitar el pinealocito en la síntesis de melatonina y otras sustancias, y su posterior secreción.

2.3.1 Biosíntesis

La melatonina es una molécula de al menos dos mil millones de años (Poeggeler y Hardeland, 1994; Macías y cols., 1999), que está presente en todos los animales y plantas donde se ha buscado, con la misma estructura molecular, situación que muy rara vez sucede en la naturaleza.

La síntesis de melatonina no tiene lugar solo a nivel de la glándula pineal. En el año 1976 se determinó la presencia de melatonina en animales

pinealectomizados. Actualmente los lugares de síntesis extrapineal conocidos son: la retina (Grace y cols., 1991), el cuerpo ciliado del iris (Aimoto y cols., 1985), la glándula lacrimal (Mhatre y cols., 1988), médula ósea (Tan y cols., 1999b) aparato digestivo (Bubenik, 1980), ovario (Itoh y cols., 1997), sistema inmune (Guerrero y Reiter, 2002) y el sistema portal hepático (Huether y cols., 1992). Así, los niveles titulares de melatonina son cientos de órdenes de magnitud mayores que los del plasma (Reiter y Tan, 2003).

El triptófano, un aminoácido aromático esencial, entra en el pinealocito desde los capilares sanguíneos a través de un transporte activo bajo control adrenérgico y sufre una hidroxilación, convirtiéndose en 5-hidroxitriptófano. Este paso limitante en la síntesis ocurre en la mitocondria (Sitaram y Lees, 1978). Posteriormente, 5-hidroxitriptófano se descarboxila mediante la L-triptófano descarboxilasa para forma 5-hidroxitriptamina o serotonina, siendo esta un importante neurotransmisor del SNC. La L-triptófano descarboxilasa está localizada en el citosol del pinealocito y su actividad está regulada por la iluminación ambiental a través de fibras simpáticas (Snyder y cols., 1964).

La serotonina tiene dos vías principales de metabolización en la glándula pineal. Puede desaminarse, o convertirse en melatonina por acción de dos enzimas que actúan sucesivamente: en primer lugar la N-acetil-transferasa (NAT), que presenta un marcado ritmo circadiano, y transfiere a la serotonina un grupo acetilo del cofactor acetil coenzima A principalmente, dando así lugar a la N-acetil-5-hidroxi-triptamina o N-acetil serotonina. A continuación la enzima hidroxiindol-O-metil transferasa (HIOMIT) va a transferir a la N-acetil-serotonina un grupo metilo de un cofactor de S-adenosil-metionina y convertirla en N-acetil-5-metoxitriptamina, melatonina (Figura 10).



Figura 10. Biosíntesis de melatonina.

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

El estímulo lumínico durante el día mantiene hiperpolarizados a los fotorreceptores lo que impide la liberación al final de la vía nerviosa de noradrenalina. En ausencia de luz, los fotorreceptores generan potenciales de acción que son conducidos por esta vía neuronal hasta los terminales simpáticos que liberan noradrenalina, que se une a receptores adrenérgicos α_1 y β_1 del pinealocito (Reiter, 1991a). Dicha unión desencadena una reacción bioquímica intracelular, que se traduce en un incremento de la expresión y actividad de la NAT, con la consecuente elevación de las concentraciones de N-acetil-serotonina y melatonina (Hardeland y cols., 1993) (Figura 11).



Figura 11. Estimulación o inhibición de la síntesis de melatonina.

Recientemente, se ha demostrado la presencia, en prácticamente todos los tejidos del organismo, de la expresión de los genes que codifican para las enzimas clave en la síntesis de melatonina (NAT e HIOMIT) (Stefulj y cols., 2001); por lo que cada tejido puede producir la melatonina que necesita en cada momento, sin depender de la melatonina circulante.

2.3.2 Distribución

La estructura indólica de la melatonina la hace una molécula bastante liposoluble, que atraviesa fácilmente por difusión simple la bicapa de la membrana del pinealocito. Esto determina que el estímulo de la síntesis de melatonina en la glándula pineal eleve rápidamente los niveles en plasma y en todos los compartimentos del organismo (Reiter, 1991b).

Una vez sintetizada, la melatonina es excretada de la glándula al torrente sanguíneo donde aproximadamente un 70% se une a la albúmina (Cardinali y cols., 1972). Se ha observado que la vida media en sangre tras la administración de una infusión intravenosa, es de unos 30 minutos (Mallo y cols., 1990). Posteriormente, es metabolizada fundamentalmente en el hígado y en menor medida en el riñón, donde sufre una hidroxilación y una conjugación con sulfato y glucurónido. En humanos el producto mayoritario resultante del metabolismo de la melatonina es la 6-sulfatoximelatonina que es eliminada a través de la orina (Arendt, 1986).

El ciclo diario de luz oscuridad es el factor regulador más importante de la producción de melatonina, de modo que los niveles comienzan a elevarse durante las últimas horas de la tarde para alcanzar el pico de producción durante la noche. Este mecanismo es muy estable cuando el patrón de luz diaria es normal, de modo que constituye un buen marcador del reloj corporal endógeno (Pang y cols., 1980; Aimoto y cols., 1985; Reiter, 1991a). Este ritmo de producción persiste aún bajo condiciones alteradas de luz (oscuridad continuada, o luz muy debilitada) indicando la existencia de un control endógeno. Dicho control desaparece cuando existen lesiones en el SNC (Brainard y cols., 2001), lo cual demuestra la importancia de este sistema en el mantenimiento y sincronización de la producción de melatonina en función de los ritmos luz-oscuridad. Los niveles endógenos de melatonina se ven fuertemente afectados por la exposición a una fuente de luz, efecto que es dependiente de la dosis y del espectro de luz, de modo que incluso una luz tenue puede llegar a suprimir los niveles nocturnos de melatonina (Lewy y cols., 1980).

El ritmo circadiano de la melatonina está fuertemente influido por la edad. Los recién nacidos y hasta los tres meses de vida producen cantidades elevadas de melatonina en relación al adulto, pero carecen de ritmo circadiano. Al final del primer año de vida es cuando comienzan a diferenciarse los niveles plasmáticos diurnos y nocturnos (Waldhauser y cols., 1993; Reiter, 1998). El ritmo circadiano se mantiene desde la pubertad hasta que en la edad adulta entre los 45 y los 65 años, decae progresivamente hasta igualarse los niveles séricos diurnos y nocturnos (Reiter, 1995). Otros factores que afectan al ritmo circadiano de la melatonina son el ciclo menstrual, el tiempo diario de exposición al sol, el consumo de algunos fármacos, el estrés y el ejercicio (Ariznavarreta y cols., 2002).

Si embargo, la melatonina sintetizada fuera de la glándula pineal escasamente pasa a la circulación, manteniendo niveles elevados de melatonina en los tejidos (Hardeland, 2008). Esto refuerza que la melatonina realice otras funciones además de la hormonal. Se pueden encontrar altas concentraciones de melatonina en el tracto gastrointestinal, la bilis o la circulación enterohepática (Tan y cols., 1999b; Pandi-Perumal, 2006).

2.3.3 Metabolismo y farmacocinética

Tras su paso por la sangre, la mayor parte de la melatonina se cataboliza en el hígado, donde se transforma en 6-hidroximelatonina, gracias a la acción de las enzimas del citocromo P_{450} , como CYP1A2, CYP1A1 o CYP1B1 (Ma y cols., 2005), o por depuración de dos [•]OH. La 6-hidroximelatonina es eliminada fácilmente por la orina al hacerse más hidrosoluble tras la conjugación hepática con anión sulfato o con ácido glucorónico (Kopin y cols., 1961; Hardeland y cols., 1993). La enzima CYP2C19, también en el hígado, produce la desmetilación de la melatonina formando N-acetilserotonina (Ma y cols., 2005).

La melatonina puede también seguir otras rutas catabólicas, como la desacetilación y posterior desaminación, en la retina (Galzin y cols., 1988; Grace y cols., 1991), o su transformación en kinureninas, en el cerebro y la glándula pineal (Pandi-Perumal y cols., 2006). Estos metabolitos de la melatonina son también altamente eficientes en reducir el daño producido por los RL (Mayo y cols., 2005).

2.3.4 Mecanismo de acción

Tras considerar a la melatonina como una hormona, se intentaron explicar sus funciones, principalmente las relacionadas con el control de biorritmos y la reproducción, a través de su interacción con receptores de membrana. Sin embargo, estudios posteriores han descrito funciones de la melatonina que eran independientes de receptores de membrana. Así, en primer lugar, se demostró que la melatonina es un potente depurador de RL (Tan y cols., 1993; Reiter y cols., 1994); en segundo lugar, se caracterizaron receptores nucleares para la melatonina en órganos periféricos (Acuña-Castroviejo y cols., 1993; Carlberg y Wiesenberg, 1995); por último, se demostró la capacidad de la melatonina para unirse a algunas proteínas

intracelulares, como la PKC (Antón-Tay y cols., 1998), la calmodulina (Huerto-Delagadillo y cols., 1994; Pozo y cols., 1997) y la calreticulina (Macías y cols., 2003).

Esquemáticamente, los mecanismos de acción de la melatonina pueden dividirse en dos, aquéllos que está mediados por su unión a un receptor, ya sea de membrana o nuclear, y aquéllos que se realizan de forma independiente de receptor como la interacción con proteínas intracelulares y la actividad antioxidante.

2.3.4.1 Mecanismos mediados por receptor

Mediante agonistas marcados se han identificado receptores de membrana para la melatonina (Dubocovich y Takahasi, 1987; Williams y Morgan, 1988). Son receptores proteicos de 420 aminoácidos, de peso molecular 47.424 kDa y con 7 dominios transmembrana hidrofóbicos (Ebisawa y cols., 1994). Funcionalmente podemos hablar de dos tipos de receptores: de alta afinidad, que incluyen a los subtipos MT₁ y MT₂; y receptores de baja afinidad, MT₃ (Dubocovich y cols., 2003).

Los receptores MT_1 y MT_2 , son receptores de membrana acoplados a proteínas G inhibidoras y que ejercen su acción principalmente mediante la inhibición de la adenilatociclasa, lo que conlleva una disminución del AMPc intracelular, la disminución de la actividad de la proteinquinasa A y la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc, CREB.

Ambos receptores han sido detectados en el cerebelo y en los bastoncillos de la retina en las células ganglionares (Scher y cols., 2002). Además de en SNC, se han encontrado receptores para la melatonina en linfocitos, células epiteliales de la próstata, células de la granulosa de los folículos preovulatorios, en espermatozoides, en la capa mucosa/submucosa del colón y en las plaquetas sanguíneas. Aún en ausencia de receptores la

melatonina es una molécula que difunde fácilmente, penetrando sin obstáculo en las células donde, unida a la calmodulina (Konakchieva y cols., 1995), ejerce funciones básicas de modulación de los procesos mitóticos y del citoesqueleto y de igual manera como potente antioxidante eliminando RL perjudiciales.

La melatonina tiene funciones en órganos en los que no se ha descrito la existencia de receptores de membrana, como el corazón o el tiroides (Reiter, 1991c; Chen y cols., 1993). La existencia de receptores nucleares de melatonina se sugirió antes de su descubrimiento, cuando se aisló melatonina en el núcleo celular, planteando que la melatonina podría actuar modificando la expresión génica en las células diana (Withyachumnarnkul y cols., 1986). Estudios posteriores pusieron de manifiesto la existencia de estos receptores, y sus resultados podrían explicar efectos de la melatonina tales como la estimulación de enzimas antioxidantes, que podrían estar mediados por la acción de un receptor nuclear (Menéndez-Peláez y cols., 1993).

Se ha descrito la unión de la melatonina con proteínas intracelulares, como calmodulina, calreticulina y la proteína quinasa c, lo que respalda la idea de que la melatonina puede contribuir a la estructura del citoesqueleto. Además, otro lugar de unión de la melatonina parece encontrarse en la mitocondria. Se ha indicado que la proteína de unión se localiza en la rampa anfipática del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Hardeland, 2008). A concentraciones elevadas, se ha demostrado que la melatonina es capaz de inhibir la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PTP) (Andrabi y cols., 2004), un hecho que sugiere un sitio de unión adicional, de baja afinidad.
2.3.5 Función antioxidante de la melatonina

La presencia de melatonina en organismos unicelulares (Poeggeler y Hardeland, 1994), o bacterias (Manchester y cols., 1995), refuerzan la hipótesis de que la melatonina es un protector celular conservado evolutivamente (Hardeland y cols., 1995; Reiter y cols., 2003).

Un mecanismo de acción de la melatonina, independiente de su interacción con receptores o con proteínas intracelulares, es su interacción con RL. Esta acción ocurre en todos los compartimentos del organismo. Ya en 1993 Tan y su equipo mostraron que la melatonina neutraliza OH (Tan y cols., 1993), partir de ese momento, son numerosos los trabajos que demuestran la capacidad de la melatonina para interactuar con EROs, y por ello, actuar como una molécula antioxidante.

2.3.5.1 Acciones directas de la melatonina

De manera directa, la melatonina es capaz de neutralizar una gran cantidad de RL, ya que es una molécula rica en electrones. Así, la melatonina reacciona directamente con ⁻OH, H₂O₂, ONOO⁻, HCIO u otros RL, para dar productos menos tóxicos que, generalmente, se excretan por la orina (Qi y cols., 2000; Reiter y cols., 2003)

Además de la capacidad intrínseca para depurar RL, la melatonina es capaz de estimular la actividad y expresión de otros sistemas antioxidantes, estableciendo así una forma de acción indirecta para la reducción de estrés oxidativo (Kotler y cols., 1998; Mayo y cols., 2002).

En primer lugar, estimula el ciclo del glutatión, aumentando la actividad de la GPx y de la GR, regulando así la relación GSSG/GSH (Barlow-Walden y cols., 1995; Pablos y cols., 1998; Martín y cols., 2000). Además aumenta la producción de glutatión por la estimulación de la γ-glutamil-cisteína sintetasa

(γ-GCS) (Urata y cols., 1999); y estimula la glucosa-6-fosfato deshidrogenada, que es la encargada de generar NADPH, requerido por la GR (Pierrefiche y Laborit, 1995). Así, la melatonina estimula otras enzimas antioxidantes como la SOD (Antolín y cols., 1996) y la CAT (Acuña-Castroviejo y cols., 2001; Reiter y cols., 2003). También inhibe otras enzimas que generan RL y además ejerce una acción sinérgica con otros antioxidantes como las vitaminas E y C (Antolín y cols., 1996; 1997; Reiter y cols., 2003).

Dado que la melatonina es tanto lipofílica (Reiter, 1991b) como hidrofílica (Shida y cols., 1994), puede realizar sus funciones antioxidantes con igual eficiencia en múltiples compartimentos subcelulares, es decir, en el núcleo (Tan y cols., 1993), en el citosol (Abe y cols., 1994) y en las membranas (Pierrefiche y cols., 1993; Giusti y cols., 1995).

Recientemente se ha descrito que la melatonina puede realizar sus funciones antioxidantes a nivel mitocondrial. Estos estudios tienen especial interés porque la mitocondria es la primera fuente de RL en las células eucariotas (Yu y cols., 1992) y además porque la melatonina es capaz de atravesar fácilmente la membrana mitocondrial, y se acumula en este orgánulo en grandes concentraciones (Martín y cols., 2000). Entre las principales acciones de la melatonina sobre la fisiología mitocondrial cabe incluir las siguientes:

- La administración crónica de melatonina incrementa el número de mitocondrias de las células (Decker y Quay, 1982).
- Estabiliza la membrana interna mitocondrial frente a las EROs (García y cols., 1999; Karbownik y cols., 2000).
- Incrementa la actividad de los complejos I y IV de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias hepáticas y cerebrales (Martín y cols., 2000; Acuña-Castroviejo y cols., 2005).

- Previene la formación de RL por la mitocondria, se sugiere que esta acción está mediada por un sitio de unión de la melatonina en el centro hierro-sulfurado N₂ del complejo I (Karbownik y cols., 2000).
- Aumenta la producción de ATP mitocondrial (Martín y cols., 2002).
- Antagoniza o previene la apoptosis modulando las funciones mitocondriales (Souderval y cols., 2006), incluyendo los efectos en la homeostasis del calcio y el potencial de membrana mitocondrial (Hardeland, 2005; Souderval y cols., 2006), y también inhibiendo el PTP (Andrabi y cols., 2006).

2.3.6 Otras funciones de la melatonina

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

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

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

Los efectos inmunomoduladores de la melatonina representan otra línea de defensa (Gurrero y Reiter, 2002; Hardeland, 2008). En la actualidad su papel antiinflamatorio está bien demostrado (Mayo y cols., 2005; Escames y cols., 2006); de hecho, los efectos antioxidantes, mediante la disminución del NO, y los efectos mitocondriales entre otros, atenúan la señal proinflamatoria (Hardeland, 2008).

La melatonina también ejerce una acción estimulante de la respuesta inmune mediante la activación de varios tipos celulares como linfocitos T y B, NK, monocitos y células del sistema mononuclear fagocítico (Hardeland, 2008) y el aumento de producción de IL-4 en linfocitos T cooperadores (CD₄) de la médula ósea y las células madre de la línea granulocítica-macrofágica (Maestroni y cols., 1994).

2.3.7 La melatonina y el hígado

Los efectos protectores de la melatonina han sido demostrados en diferentes modelos experimentales de enfermedades hepáticas. Así, se ha demostrado que la administración de melatonina a ratas, previene la fibrosis inducida por tetracloruro de carbono (Ogeturk y cols., 2008; Hong y cols., 2009), mejora la hepatitis no alcohólica inducida por una dieta deficiente en metionina y colina (Tahan y cols., 2009), tiene efectos beneficiosos durante la

isquemia y reperfusión hepática (Kim y Lee, 2008) o impide la hepatotoxicidad inducida por diferentes fármacos (Kurus y cols., 2009). La melatonina también protege contra el daño hepático agudo inducido por agentes químicos como tioacetamida o galactosamina (Tunez y cols., 2007; Wang y cols., 2007). Los mecanismos responsables de los efectos beneficiosos de la melatonina incluyen una reducción de la generación de EROs, la protección de las macromoléculas contra el estrés oxidativo y una mayor actividad de enzimas antioxidantes (Korkmaz y cols., 2009). La respuesta antioxidante celular contra las EROs está regulada por Nrf2, y se ha indicado que la melatonina activa Nrf2 en la prevención de daño hepático oxidativo en ratas tratadas con dimetilnitrosamina (Jung y cols., 2009).

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Aparatos

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

- Autoanalizador, modelo Reflotrón.
- 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-10k. Rotor 70:1 Ti.

Eppendorf, modelo 5451C.

Sorvall, modelo RC-5B.

- Cubeta electroforesis vertical: Biorad miniproteal 3 cell.
- Desecador de geles: Biorad 583.
- Espectrofluorímetro: Hitachi, modelo F-2500.
- Espectrofotómetro: Hitachi, modelo U-200.
- Escáner para diapositivas: Nikon LS-30[®].
- Fuente de alimentación: Biorad, 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.
- Meteor, modelo 991 A
- Microscopios ópticos: Nikon OPTIPHOT-2.

Nikon Eclipse E 400®.

Nikon Provise AX 70®.

- Microtomo de rotación: Leitz 1512.
- Nanodrop: NanoDrop Technologies ND-100 UV/VIS
- Película para diapositivas: Ektachrome 100ASA.
- pHmetros: Crison, modelo 2001.
- Sistema de transferencia de proteínas: Biorad, Transbot 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; KH₂PO₄ 1,4 mM; NaHPO₄ 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 30 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 tipo P2 climatizada a 22°C y con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Durante una semana se les mantuvo en periodo de aclimatación. Los experimentos fueron realizados de acuerdo con la Declaración de Helsinki (2000) de la Asociación Médica Mundial, y las regulaciones españolas del uso de animales de laboratorio (RD 1201/2005), y fueron aprobados por el Comité de ética de la Universidad de León. Se procuró en todo momento minimizar el sufrimiento animal y reducir el número de animales usados.

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 se empleó la técnica de hemoaglutinación. Se dispensaron 50 µl de SSF en todos los pocillos y 50 µl del sobrenadante filtrado del homogeneizado de tejido hepático en el primer pocillo. Posteriormente se hicieron diluciones dobles seriadas en placas de microtitulación de fondo en "V" y se añadieron 50 µl de una disolución de glóbulos rojos humanos del tipo 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 una película plástica adhesiva y se incubaron toda la noche a 4°C. La dilución más alta en la que se observó hemoaglutinación completa

contiene una unidad hemoaglutinante en el volumen del inóculo vírico depositado (Figura 12).



Figura 12. Titulación del virus de la RHD por la técnica de hemoaglutinación

3.4.3 Inoculación de los animales y grupos experimentales

De los 30 conejos utilizados, 18 fueron inoculados por vía intramuscular con 2x10⁴ unidades hemoaglutinantes de la cepa AST/89 del virus de la RHD en un volumen total de 300 µl de SSF a las 21 horas. Como controles no infectados se utilizaron 12 animales, que recibieron 300 µl de SSF. De los 12 animales que fueron utilizados como control, 6 (Control) recibieron inyecciones del vehículo (etanol al 5%) a las 0, 12 y 24 horas después de la infección (hpi), y otros 6 (Control + Mel) recibieron una dosis de melatonina (Sigma, St Louis, MO, USA) de 20 mg/kg a las mismas horas. La melatonina se diluyó en etanol absoluto y se hicieron posteriores diluciones en SSF hasta alcanzar una concentración de etanol del 5%, que fue la que se administró a los conejos a través de una inyección intraperitoneal. Los 18 animales infectados con el RHDV se dividieron en tres grupos experimentales, un grupo de 6 animales que recibieron vehículo (RHDV), otro grupo de 6 animales que recibieron

melatonina a una dosis de 10 mg/kg (RHDV + Mel10) y otros 6 animales que recibieron 20 mg/kg de melatonina (RHDV + Mel20), a las 0, 12 y 24 hpi.

Los grupos experimentales utilizados en nuestro estudio se resumen a continuación:

- Grupo de conejos control: Control
- Grupo de conejos control + melatonina: Control+Mel
- Grupo de conejos infectados: RHDV
- Grupo de conejos infectados, tratados con melatonina a dosis de 10 µg/kg de peso: RHDV+Mel10
- Grupo de conejos infectados, tratados con melatonina a dosis de 20 µg/kg de peso: RHDV+Mel20

3.4.4 Recogida de muestras

Se recogieron de la vena marginal de la oreja muestras de sangre en tubos heparinizados a las 12, 24 y 36 hpi. El plasma resultante de la centrifugación de la sangre durante 10 minutos a 2.500 xg a 4°C, se congeló a - 80°C para realizar las determinaciones de los parámetros bioquímicos. Los animales fueron sacrificados a las 36 hpi con una inyección intravenosa de pentobarbital sódico e inmediatamente se realizó la necropsia. El hígado se pesó, se troceó y se lavó en SSF frío, posteriormente se congeló por inmersión en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C para determinaciones moleculares.

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Determinaciones en plasma

3.5.1.1 Actividad de la aspartato aminotransferasa (AST)

La actividad de la AST se determinó en plasma mediante una prueba comercial (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). Los análisis se llevaron a cabo en el laboratorio del Hospital de León.

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 (H₂O₂). En presencia de POD, el H₂O₂ 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 µl 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/I.

3.5.1.2 Actividad de la alanino aminotransferasa (ALT)

La actividad de la ALT se determinó en plasma mediante una prueba comercial (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). Los análisis se llevaron a cabo en el laboratorio del Hospital de León.

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 H₂O₂. En presencia de POD, el H₂O₂ 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 µl 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/I.

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 de la glucosa oxidasa y la 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/HCI (10 mM; pH 7,4) y una mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF, aprotinina e inhibidor de tripsina) (Roche Diagnostics GMBH, Manheim, 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. Se realizaron alícuotas del sobrenadante en tubos eppendorf que se almacenaron hasta su uso a -80°C.

3.5.3.2 Obtención de las fracciones citosólica y nuclear

Para la obtención de la fracción citosólica las muestras se homogeneizan tal y como se describe en el apartado anterior, con una posterior centrifugación a 12.000 xg durante media hora y a 4°C. El sobrenadante que resulta de dicha centrifugación es recolectado y almacenado a -80°C hasta la realización de las determinaciones analíticas.

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

Reactivos:

- Reactivo A: 10 mM Hepes NaOH (pH 7,9), 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF.
- Reactivo B: 20 mM Hepes-NaOH (pH 7,9), 25% glicerol, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA (pH 8), 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF.
- Nonidet: octilfenoxipolietoxietanol.

Para la obtención de los extractos nucleares se homogeneizan 50 mg de tejido en 2 ml de tampón A con un 0,1% de Nonidet, utilizando potters y vástagos autoclavados. Tras 15-60 minutos de incubación en hielo se centrifugan las muestras 10 minutos a 1000 xg a 4°C y se descarta el sobrenadante resultante. El pellet se resuspende nuevamente en 2 ml de tampón A sin detergente, se agita vigorosamente en vórtex y se centrifuga 10 minutos a 1.000 xg a 4°C. Al pellet resultante se le añaden 50 µl de tampón. Posteriormente, se incuba en hielo durante 30 minutos y se centrifuga a 4°C durante 15-30 minutos a 14.000 xg para recoger el sobrenadante que se almacena a -80°C hasta su posterior análisis.

3.5.3.3 Concentración de proteína

Se utilizó la técnica descrita por Bradford (Bradford, 1976). El método Bradford se basa en la unión cuantitativa de un tinte, Coommassie Brilliant Blue, a una proteína desconocida y en comparar esta unión a diferentes cantidades de proteína estándar, albumina sérica bovina (BSA).

El Coomassie Brilliant Blue es un pigmento de tipo trifenilmetano amónico, que se une de forma no covalente a los restos de lisina de las proteínas.

Reactivos:

- Solución de BSA patrón (0,5 mg/ml) (Sigma-Aldrich).
- H₂O milliQ
- Coomassie Brilliant Blue solution Bradford (Bio-rad).

Se preparó la curva patrón y las muestras problema por triplicado en una placa de 96 pocillos. La mezcla de reacción se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad y se leyó la absorbancia a 595 nm. La concentración se expresa en mg de proteína/ml.

3.5.3.4 Concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

La cantidad de productos aldehídicos generados por la peroxidación lipídica se cuantificó midiendo la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para este propósito se utilizó una cantidad final de proteína de 3 mg por muestra. Las muestras fueron incubadas a 90°C durante 30 minutos después de añadir 500 µl de 0,37% de ácido tiobarbitúrico en 15% de ácido tricloroacético, posteriormente se centrifugó a 4°C a 2.000 xg durante 15 minutos. La absorbancia espectrofotométrica se determinó en el sobrenadante a 535 nm. Como blanco se utilizó la mezcla de incubación.

3.5.3.5 Concentración de glutatión reducido (GSH)

Fundamento:

Se siguió el procedimiento descrito por Hissin y Hilf (1976), basado en la reacción específica del GSH con el optaldehído (OPT) a pH 8,0 formándose un producto altamente fluorescente que se activa a 350 nm con un máximo de emisión a 420 nm. Para ello, se utilizaron los sobrenadantes de homogeneizados hepáticos preparados con 0,2 g de tejido en tampón fosfato sódico/EDTA (0,1 M); pH 8,0 y H_3PO_4 al 25% y centrifugados a 100.000 xg durante 30 minutos a 4°C.

Método:

Se incubó, a temperatura ambiente y durante 15 minutos, la siguiente mezcla:

- 1,8 ml de tampón fosfato/ EDTA (0,1 M; pH 8,0)
- 0,1 ml de homogeneizado diluido (0,5 ml en 4,5 ml del mismo tampón)
- 0,1 ml de OPT (7,5 μM)

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

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

3.5.3.6 Concentración de glutatión oxidado (GSSG)

Fundamento:

Se determinó según el método de Hissin y Hilf (1976), con algunas modificaciones. Dicho método se basa en la reacción del GSSG con el fluoróforo OPT a pH 12; a este elevado pH del medio, la conversión de GSH a GSSG es prácticamente nula. Para la realización de la técnica, se utilizaron los mismos sobrenadantes de homogeneizados hepáticos descritos en el apartado anterior.

Método:

Se introdujeron, en tubos de rosca, 0,5 ml de vinilpiridina y 1 ml de sobrenadante de homogeneizado hepático. La mezcla se agitó vigorosamente durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron 9 ml de NaOH (0,1 N) y se agitó de nuevo.

Se incubaron, a temperatura ambiente durante 15 minutos en oscuridad:

- 0,1 ml de la mezcla anterior
- 1,8 ml de NaOH (0,1 N)
- 0,1 ml de OPT (7,5 μM)

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

3.5.3.7 Actividad de la glutatión S-transferasa (GST)

Fundamento:

Se determinó utilizando la reacción del glutatión con 1-cloro-2,4dinitrobenceno (CDNB) (Habig y cols., 1974), un sustrato de amplio espectro para la actividad catalítica de todas las isoformas de GST.

Método:

La mezcla de incubación contenía, en un volumen final de 1 ml, las siguientes sustancias:

- Tampón fosfato sódico (0,2 mM; pH 6,5)
- CDNB (20 mM)
- GSH (20 mM)

Dicha mezcla se incubó a 25°C durante 3 minutos y posteriormente se añadió la muestra (fracción citosólica), y se monitorizó el incremento de absorbancia a 340 nm durante 3 minutos.

La actividad GST se calculó considerando un coeficiente de extinción molar del CDNB de 9,6 nM⁻¹cm⁻¹. Los valores se expresaron en nmol de CDNB formados/mg de proteína y minuto.

3.5.3.8 Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)

Fundamento:

La actividad GPx se determinó según el método de Flohé y Güntzler (1985). La determinación espectrofotométrica de la actividad GPx conlleva la medida de la oxidación de NADPH por la GR.

Dicha oxidación puede ser registrada espectrofotométricamente a 340 nm.

Método:

La mezcla de incubación contenía:

- 50 µl de tampón fosfato (0,1 M; pH 7,0)
- 50 µl de muestra (fracción citosólica hepática)
- 100 µl de GR (2 U)
- 50 µl de GSH (40 mM)
- 50 µl de NaN₃ (20 mM)
- 50 µl de NADPH (2,4 mM)

Se determinó la variación de la absorbancia a 340 nm, inducida por el consumo de NADPH que no depende del hidroperóxido, tras la incubación de la mezcla durante 5 minutos a 25°C. Posteriormente, se añadieron 100 μ l de la solución de H₂O₂ 2 mM y se registró nuevamente la disminución de la absorbancia a la misma longitud de onda. Como blanco se utilizó la mezcla de incubación.

El coeficiente de extinción molar del NADP+ es de 6,2 mM⁻¹ x cm⁻¹. La concentración se obtuvo de la forma siguiente:



3.5.3.9 Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

Fundamento:

La actividad SOD se midió por la técnica de Misra y Fridovich (1972). Se basa en la inhibición por la SOD de la formación de adenocromo en la autooxidación de la epinefrina.

La SOD se puede medir espectrofotométricamente siguiendo el cambio de absorbancia de la epinefrina a 480 nm.

Método:

La mezcla contenía:

- 750 µl de tampón bicarbonato 0,05 M EDTA 2 mM a pH 10,2
- 100 µl de muestra (fracción citosólica hepática o fracción mitocondrial)
- 150 µl de epinefrina 4 mM

Se determinó la variación de absorbancia durante 3 minutos a 480 nm inducida por la formación de adenocromo a partir de epinefrina.

Se realizó una curva patrón de SOD para determinar la cantidad de enzima presente.

3.5.3.10 Western blot

La determinación de las proteínas se llevó a cabo mediante la técnica de Western blot utilizando el sistema de Laemmli publicado en 1970 (Laemmli, 1970).

Reactivos:

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

1) Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se tomaron entre 10-50 µg de proteína a la que se le añadió solución de ebullición y se incubó 2 minutos a 100°C. A continuación se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (entre 9-15%) en tampón de electroforesis.

Para la realización del gel se preparó la siguiente mezcla (para 12%):

- 3 ml de mezcla acrilamida/bisacrilamida (Sigma, Chemical Co. San Louis, USA).
- 4,75 ml de tampón Tris/HCl 0,75 M, pH 8,8
- 0,5 ml de SDS al 10%
- 0,43 ml de persulfato amónico al 1%
- 0,3 ml de TEMED al 1%
- 1 ml de agua milliQ

2) Transferencia

Las proteínas ya separadas se transfirieron a unas membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno, Millipore, Bedford, MA, USA) para permitir su exposición a los anticuerpos. Para realizar la transferencia se utilizó un sistema semiseco a 13 V durante 20 minutos. Después se bloquearon las membranas en solución de bloqueo durante 30 minutos a 37°C.

3) Incubación con anticuerpo primario.

Las membranas se incubaron toda la noche con cada uno de los siguientes anticuerpos específicos: Nrf2, Bcl-2, Bcl-xL, Fas-L, PARP-1, Cit-c, laminina, TLR4, DAF, HGF, c-Met (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), JNK, p-JNK, STAT-3, p-STAT-3, ERK1/2, p-ERK1/2 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), c-FLIP, TNF-R1 (Abcam, Cambridge, UK) y β -actina (Sigma, St Louis, MO, USA), con diluciones entre 1:200 y 1:2.000.

Transcurrido este periodo, se lavaron las membranas tres veces durante 10 minutos en PBS-Tween. Posteriormente, se incubaron 1 hora con un anticuerpo anti conejo, ratón o cabra (según el anticuerpo primario) (Dako, Glostrup, Denmark). Finalmente, se volvieron a lavar 3 veces en PBS-Tween.

4) Revelado

La detección de la proteína se realizó por quimioluminiscencia utilizando ECL (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) exponiendo las membranas durante 1 minuto a la mezcla reactiva comercial. Posteriormente, se introdujeron 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).

3.5.3.11 Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)

La determinación de la activación del factor de transcripción Nrf2 se realizó mediante la técnica EMSA (del inglés: "electrophoretic mobility Swift assay").

Los extractos nucleares fueron obtenidos según el método descrito anteriormente. Se examinó la activación del factor de transcripción Nrf2 usando el oligonucleótido específico:

5' – TGG GGA ACC TGT GCT GAG TCA CTG GAG – 3'

3' – ACC CCT TGG ACA CGA CTC AGT GAC CTC – 5'

La sonda se marcó con polinucleótido quinasa T4. La reacción de unión incluía 10 µg 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 mercaptoetanol; 20% glicerol y 1 µg de poli(dI-dC)). Después de 15 minutos en hielo se añadió el oligonucleótido (2µl) 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 a 4°C. El gel se secó en un desecador de geles y se sometió a auto-radiografía durante toda la noche a -80°C. Se introdujo en un cassete heremético con una película de alta sensibilidad (Amersham Pharmacia, Piscataway, USA).

Con el fin de verificar que los resultados del EMSA no se deben a uniones inespecíficas, se llevaron a cabo experimentos de competición utilizando un control negativo, que contiene todos los reactivos excepto la muestra y un competidor no específico, para el que se usó un oligonicleótido diferente a la secuencia citada anteriormente.

3.5.3.12 Extracción, purificación y cuantificación del ARN

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

Reactivos:

- Trizol®LS
- Cloroformo (Sigma-Aldrich)
- Alcohol isopropílico (Sigma-Aldrich)
- Etanol al 75% en agua con DEPC
- Agua libre de ARNasas (Ambion, Austin, USA)

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

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

El homogeneizado obtenido se centrifugó a 4°C durante 15 minutos a 12.000 xg, obteniéndose así tres fases: una fase inferior orgánica de color rosa que contiene proteínas, ADN y fenol, una fase intermedia con fenol y cloroformo y una fase superior acuosa incolora en la que se encuentra el ARN en suspensión.

A la fase acuosa obtenida se le añadió 0,5 ml de alcohol isopropílico y se mezcló por inversión. A continuación se incubó durante 10 minutos a 25°C y se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 12.000 xg.

El ARN precipitado en forma de pellet se lavó con 1 ml de etanol al 75%. Para ello se agitó en vórtex y se centrifugó nuevamente a 4°C durante 5 minutos a 7.500 xg.

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

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

Pureza= A260/A280

Para la cuantificación del ARN total se utilizó un NanoDrop.

3.5.3.13 Tratamiento del ARN con ADN-asas

Se utilizó el kit RQ1 RNase-free DNase (Promega, Madison, WI, USA) con el fin de degradar las cadenas de ADN simples y dobles, en presencia de Mg_2^+ , y así poder disponer de oligonucleótidos con extremos 3'-OH libres.

Los reactivos utilizados fueron:

- Tampón RQ1 ADNasa 10x: Tris HCl 400 mM, pH 8; MgSO₄ 100 mM; CaCl₂ 10 mM
- ADNasa libre de ARNasa RQ1
- ADNasa RQ1 Stop Solution 20 mM ácido etilén glicol tetraacético (EGTA), pH 8

El tratamiento de ADNasas se llevó a cabo al mezclar los siguientes volúmenes:

- 2 µg de ARN
- Enzima ADNasa libre de ARNasa (1 U/ µg ARN)
- Tampón RQ1 ADNasa 10x

La mezcla de reacción se completó con agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 50 µl. A continuación, se incubó a 37°C durante 30 minutos, tras los cuales se añadió 1 µl de ADNasa RQ1 Stop Solution para parar la reacción. Seguidamente, se incubó de nuevo a 65°C durante 10 minutos para activar así las ADNasas.

3.5.3.14 Reacción de la transcripción reversa

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

Reactivos:

Tampón RT-PCR 10x: Tris HCl 100 mM; KCl 500 mM; MgCl₂ 15 mM; pH 8,3

- Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) 25x
- Iniciadores (mezcla de nucleósidos) 10x
- Transcriptasa reversa MultiScribe (50 U/ml)
- Inhibidor de ARNasas (1 U/ml)
- Agua tratada con DEPC

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

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

• 1 µl de inhibidor de ARNasas

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

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

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

La PCR se realizó según el procedimiento descrito por Mullis y Faloona (Mullis y Faloona, 1987) y por Saiki y cols. (Saiki y cols., 1989), basado en el proceso natural de replicación del ADN con amplificación cíclica.

Partiendo de una molécula de ADN diana es posible amplificar una secuencia específica contenida en ella mediante la utilización de oligonucleótidos iniciadores diseñados a tal efecto.

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

En el presente estudio, se realizó la metodología de la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR) para la estimación de la concentración de ARNm. Como gen housekeeping, para normalizar los resultados, se utilizó el gen GADPH que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

Reactivos:

- Fast Start Universal Master Mix (Roche Applied Science, Basilea, Suiza)
- Sybergreen PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemania)

- Iniciadores (Tib Molbiol, Berlin, Alemania)
- Agua libre de nucleasas (Ambion, Llfe Technologies)

En una placa de 96 pocillos se preparó la siguiente mezcla de reacción con un volumen final de 25 µl:

a) Syber Green

- 1 µl de iniciadores (sentido y antisentido)
- 1 µl de ADNc
- 12,5 µl de Sybergreen PCR Master Mix (Roche Applied Science, Basilea, Suiza)
- 10,5 µl de agua libre de nucleasas (Ambion, Life Technologies).

Los oligonucleótidos utilizados en la RT-PCR como iniciadores en la amplificación de fragmentos correspondientes a cada gen fueron los siguientes:

b) Taqman

- 1 µL de sonda primer del gen específico (Applied Biosystems, Life Technologies)
- 1 µl de sonda primer del gen control (Applied Biosystems, Life Technologies)
- 1 µl de ADNc
- 10 µl de Fast Start Universal Master Mix (Roche Applied Science, Basilea, Suiza)
- 7 µl de agua libre de nucleasas (Ambion, Life Technologies).

Gen	Sentido	Antisentido
Mn-SOD	5'GGGTTGGCTCGGCTTCA 3'	5'CGCACACGCAGCAATCTG 3'
Cu,Zn-SOD	5'ACCATCCACTTCGAGCAGAAG 3'	5'GTCCTGTTATGCGTCCCTTGA 3'
GPx	5'CAAGGTGCTGCTCATTGAGAAT 3'	5'GTGTAGTCCCGGACCGTAGTG 3'
GST	5'CAGTGCGATCGCCAGCTT 3'	5'GGCTGCTGATTCTGGTTTTCA 3'
HMGB1	5' CTTTGTGCAAACTTGCCGG 3'	5´ TCACCAATGGACAGGC 3´
HGF	5´ CGGTAAAGACCTACAGGAAAACT 3´	5' ACGGTCCCCCTTCT 3'
C-Met	5' CTGGGCACCGCAAGATA 3'	5' GGATGCCAGGTGCAA 3'
EGF	5' GTCTGGCCCCCAGCTA 3'	5′ CGTAAGATGGTCGAT 3′
EGFR	5' CGAGACCTGTGCTATGCAA 3'	5′ TGGAGGTTCCAAAAA 3′
PDGF-B	5' TGCGAACGCAATCT 3'	5′ TACAAGTCTGTTGAGGTGAT 3′
PDGFR-β	5' CTCCGATGCCTACTACGTCTACA 3'	5′ CACAGAGACGTTG 3′
VEGFR	5´ AGGAAGGAGGACGAAGGTCTCTA 3´	5' CTCTCACACAGCCAAGGACACT 3'
β-actina	5' GGCATCCTGACGCTCAA 3'	5′ CAGTTGGTCACGAT 3′
GADPH	5'GGCAAAGTGGAGGTTGTCGCC 3'	5'CCCGTTCTCAGCCTTGACCGT 3'

Tabla 2. Secuencias específicas utilizadas para la RT-PCR por Syber Green.

Gen	Sonda primer	
TLR4	NM_001082732	Oc03398503_m1
IL-1β	NM_001082201	Oc03823250_s1
CRP	NM_001082265	Oc04097105_s1
IL-6	NM_001082064	Oc04097052_m1
TNF-α	EF_472913	Oc03396507_m1
VEGF	AF_022179	Oc03395999_m1
MMP-9	NM_001082203	Oc03397520_m1
GADPH	NM_001082253	Oc03823402_g1

 Tabla 3. Sondas específicas utilizadas para la RT-PCR por Taqman.

Las condiciones del termociclador fueron las siguientes:

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

Las etapas 2 y 3 se repitieron a lo largo de 50 ciclos. Cada experimento incluyó un control negativo de cada una de las muestras de ARN que no fueron sometidas a la transcripción reversa. Dicha muestra no dio lugar a producto de PCR alguno, confirmándose la ausencia de ADN genómico extraño o producto de PCR que pudiera haber contaminado la muestra previamente. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador ABI 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Los cambios relativos en la expresión génica se determinaron mediante el cálculo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.5.3.16 Estudio inmunohistoquímico

Para los estudios de la expresión inmunohistoquímica se realizaron cortes de tejido de 4 µm que se tiñeron por el método de la peroxidasaantiperoxidasa (Sternberg y cols., 1970). La peroxidasa endógena es bloqueada por inmersión de las secciones histológicas, durante 10 minutos, en peróxido de hidrógeno al 3% en metanol preparado en el momento, seguido por tratamiento con tripsina al 1% en cloruro cálcico (pH 7,8) durante 10 minutos a 37°C. Las secciones se lavaron con agua corriente y se aclararon con un tampón de solución salina/Tris con el 1,6% de NaCl (TST) y se incubaron con una mezcla al 10% (v/v) de un suero de cabra normal y al 3% (p/v) de albúmina sérica bovina en TST, durante 15 minutos. Después del secado, las secciones se incubaron durante toda la noche a 4ºC con anticuerpos específicos frente a Nrf2 (SantaCruz Biotechnology, CA, USA) o caspasa 3 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Varias secciones de cada grupo de experimentos se emplearon como controles séricos mediante la omisión del suero inmune primario y su sustitución con suero preinmune. Posteriormente, se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario diluido 1:4.000; más tarde, se aplicó el sistema de detección de inmunohistoquímica formado por la inmunoglobulina anticonejo biotinilada y el conjugado estreptavidin peroxidasa. Ambos reactivos detectan el antígeno presente en el tejido reaccionando con el anticuerpo primario. Para que esta reacción fuera visualizada se aplicó una gota de solución sustrato cromógena diaminobencidina líquida (DAB) al 0,1% durante 10 minutos a temperatura ambiente utilizando como colorante de contraste la hematoxilina.

3.5.3.17 Actividad de las caspasas 3, 8 y 9

Fundamento:

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

Método:

Una vez obtenidos homogeneizados hepáticos, estos se incubaron durante una hora a 37°C, en un tampón Hepes 20 mM, glicerol 10%, DTT 2 mM, pH 7.5, que contenía 100 µM del sustrato fluorogénico específico 7-amino-4-metilcumarina N-acetil-L-aspartil-L-glutamil-L-valil-L-aspártico amida (Ac-DEV-AMC), 7-amino-4-trifluorometilcumarina N-acetil-L-isoleucil-L-glutamil-Ltreonil-L-aspártico amida (Ac-IETD-AFC) y 7-amino-4-metilcumarina N-acetil-Lleucil-L-glutamil-L-histidil-L-aspártico amida (Ac-LEHD-AMC) para las caspasas 3, 8 y 9 respectivamente (Alexis Biochemicals, San Diego, California, EE.UU.).

El procesamiento de los sustratos fluorogénicos se monitorizó por medio de un lector de microplacas (Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Inc.) a unas longitudes de onda de excitación/emisión de 360/460 nm para la actividad de la caspasa 3, 400/505 nm para la actividad de la caspasa 8 y 380/505 nm para la caspasa 9. La actividad se expresó como unidades arbitrarias de fluorescencia por miligramo de proteína por minuto de incubación (UAF/mg prot/min).

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 realizó posteriormente el test de Newman-Keuls. Se consideró que existían diferencias significativas cuando p<0,05.

Para el tratamiento de los datos y su análisis estadístico se utilizó el software comercial SPSS+ vrs.19.0 (IBM, Chicago, Illinois, EE.UU.).

4 RESULTADOS
4.1 Efectos del RHDV y la melatonina sobre diversos parámetros plasmáticos y marcadores de estrés oxidativo

En el FHF se produce una marcada necrosis hepática que se refleja por el aumento de transaminasas en plasma. En nuestro modelo la actividad de las enzimas AST y ALT aumentó en el grupo de animales infectados con el RHDV en comparación con el grupo de animales control. El tratamiento con melatonina previno estos efectos de forma dependiente de la concentración (ALT, RHDV+Mel10: -49%, RHDV+Mel20%: -79%; AST, RHDV + Mel10: -55%, RHDV+Mel20: -85%) (Figura 13).



Figura 13. Actividad plasmática de ALT y AST en los diferentes tiempos de estudio (12, 24 y 36 hpi). Valores medios \pm E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^bP <0,05 con respecto al grupo RHDV + Mel 10.

Una gran parte de pacientes con FHF muere con una importante depleción en la concentración de glucosa en sangre. Los niveles de glucosa en sangre se midieron a diferentes tiempos durante la infección. Los resultados obtenidos muestran una disminución en la concentración glucosa provocada por la infección por RHDV, y que fue prevenida por la melatonina tanto a la dosis de 10 como a la de 20 mg/Kg (Figura 14).



Figura 14. Concentración de glucosa en sangre en los diferentes tiempos de estudio (12, 24 y 36 hpi). Valores medios \pm E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo RHDV.

En este estudio, se determinaron las concentraciones de TBARS, GSH y GSSG, como marcadores de estrés oxidativo.

Como puede observarse en la Figura 15, la concentración hepática de TBARS fue significativamente mayor en conejos del grupo RHDV, mientras que los valores disminuyeron significativamente en los animales que recibieron melatonina (RHDV+Mel10: -47%; RHDV+Mel20: -40%) hasta alcanzar valores similares a los del grupo control.



Figura 15. Concentración hepática de TBARS en los diferentes grupos de estudio. Valores medios \pm E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.

El GSH disminuyó significativamente en los animales infectados (-35%), mientras que se produjo un aumento significativo en la concentración de GSSG (+53%). La infección experimental se tradujo un aumento significativo en la relación GSSG/GSH (137%). Estos efectos fueron evitados de forma parcial en el grupo RHDV+MEL10 (GSSG/GSH: -34%, GSH: +44%), y de forma casi completa en el grupo RHDV+MEL20 (GSSG/GSH: -57%, GSH: + 71%) (Figura 16).



Figura 16. Relación hepática GSSG/GSH de los diferentes grupos de estudio. Valores medios \pm E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.

4.2 Efectos del RHDV y la melatonina sobre la expresión y actividad de diversas enzimas antioxidantes

Con el fin de comprobar los efectos sobre el estado antioxidante de los animales infectados por el RHDV, así como de la administración de la melatonina, se determinó la actividad enzimática de las formas mitocondrial y citosólica de la SOD, Mn-SOD y Cu-Zn-SOD, respectivamente. En el grupo RHDV disminuyó de forma significativa la actividad de la Mn-SOD (-44%). La melatonina fue capaz de evitar este cambio, tanto en el grupo RHDV+Mel10 (+48%) como en el grupo RHDV+Mel20 (+62%), como se muestra en la Figura 17. La actividad de la Cu-Zn-SOD aumentó un 40% en el grupo de conejos infectados con el RHDV. Este efecto fue parcial o totalmente prevenido por la administración de melatonina tanto a la dosis de 10 como de 20 mg/kg (-19% y -26%, respectivamente) (Figura 17). Para determinar si los cambios eran a nivel transcripcional se realizaron RT-PCR para ambas enzimas, y los

resultados mostraron una inducción en la expresión de la Mn-SOD y una represión de la Cu,Zn-SOD provocado por la melatonina (Figura 18).



Figura 17. Actividad hepática de las enzimas antioxidantes Mn-SOD, Cu,Zn-SOD, GPx y GST en los diferentes grupos de estudio. La actividad se expresa como unidades de fluorescencia por miligramo de proteína por minuto de incubación. Valores medios \pm E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.

Las actividades de la GPx y de la GST se redujeron significativamente en el grupo RHDV respecto al grupo Control (-75% y -16%, respectivamente). Los cambios en ambas enzimas fueron evitados por la melatonina de manera dependiente de la concentración (GPx, RHDV+Mel10: +181%, RHDV+Mel20: +264%; GST, RHDV+Mel10: +9%, RHDV+Mel20: +13%) respecto al grupo RHDV (Figura 17). Los resultados de la expresión relativa de ambas enzimas se corresponde con su actividad (Figura 18).



Figura 18. Contenido de ARNm de las enzimas antioxidantes Mn-SOD, Cu,Zn-SOD, GPx y GST en los diferentes grupos de estudio expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios \pm E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.

4.3 Efectos del RHDV y la melatonina sobre la expresión y activación del Nrf2

Para determinar la participación del factor Nrf2 en la regulación génica de las enzimas antioxidantes se midieron los niveles de proteína por Western blot. Los datos obtenidos indican que la melatonina induce una mayor expresión del factor de transcripción Nrf2 tanto en el citosol como en el núcleo de las células hepáticas de conejos infectados con el RHDV y tratados con melatonina. Este efecto fue aún mayor en los animales que recibieron melatonina a la dosis más alta, y en especial en la fracción nuclear (Nrf2 citosólico, RHDV+Mel10: +10%, RHDV+Mel20: +154%; Nrf2 nuclear, RHDV+Mel10: +97%, RHDV+Mel20: +202%) (Figura 19). Para comprobar *in*

Tesis doctoral: Almudena Laliena Izquierdo

situ la expresión de Nrf2 se realizó una inmunohistoquímica que reveló un gura 20. Detenarcadominos monton de la expresión de Nefatica des la gados de los conejos anscripción Nrf2 en los diferentes grupos de estudio. Aumentos: 400x. infectados y tratados con melatonina con respecto a los conejos infectados no

tratados (Figura 20).



Figura 19. Expressión hepática del factor de transcripción Nrf2 en la fracción citosólica y nuclear. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios ± E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.



En condiciones normales el Nrf2 se encuentra en el citosol inhibido por la proteína represora asociada Keap1, lo que fomenta su permanente degradación. En este estudio se midió la cantidad de proteína en el hígado de los conejos mediante western blot y no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos de estudio en la cantidad de proteína (Figura 21).



Figura 21. Expresión hepática de la proteína Keap1. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios \pm E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.

Finalmente, para comprobar si la translocación nuclear de Nrf2 estaba acompañada por su unión a la región ARE en sus genes diana, se realizó un EMSA que puso de manifiesto que la capacidad de Nrf2 para unirse a ARE aumentaba significativamente en los animales tratados con melatonina respecto a los animales infectados no tratados (Figura 22).



Figura 22. Activación del factor Nrf2 y su unión a ARE. EMSA representativo de los diferentes grupos de estudio.

4.4 Efecto del RHDV y la melatonina sobre la inflamación hepática

La activación de TLR4 puede activar las cascadas de mediadores proinflamatorios y, por tanto, agravar el daño en múltiples formas de enfermedad hepática aguda. En este estudio se constató que la administración de melatonina atenúa significativamente el aumento de expresión de ARNm de TLR4 producido por el RHDV (RHDV+Mel10: -20%, RHDV+Mel20: -57%) (Figura 23).



Figura 23. Contenido de ARNm de la proteína TLR4 en los diferentes grupos de estudio expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios ± E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.

La melatonina también indujo una disminución significativa en los niveles de la proteína TLR4 en el hígado (RHDV+Mel10: -32%, RHDV+Mel20: -36%) (Figura 24).



Figura 24. Expresión hepática de la proteína TLR4. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios ± E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.

HMGB-1 es una proteína nuclear que se libera en durante el daño celular, y es un marcador de necrosis; en numerosos pacientes de FHF se ha

encontrado una elevada concentración de esta proteína. La expresión hepática de HMGB-1, cuya unión a TLR4 media sus efectos en el daño hepático, aumenta significativamente en los conejos infectados, mientras que se mantiene en valores similares al control en los conejos tratados con ambas dosis de melatonina (RHDV+Mel10: -81%, RHDV+Mel20: -83%) respecto al grupo RHDV (Figura 25).



Figura 25. Contenido de ARNm de la proteína HMGB-1 en los diferentes grupos de estudio expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios \pm E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.

Por otro lado, determinamos la expresión de DAF, una molécula que modula la interacción entre los TLRs y el complemento. En los conejos afectados por la RHD la concentración de proteína del DAF se encuentra disminuida de forma muy marcada, mientras que en los conejos infectados y tratados la melatonina se mantienen valores similares a los del grupo control (RHDV+Mel10: +196%, RHDV+Mel20: +110%) respecto al grupo RHDV (Figura 26).



Figura 26. Expresión hepática de la proteína DAF. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios \pm E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.

Se ha demostrado que las citoquinas proinflamatorias juegan un papel clave en la lesión hepática aguda de diversas etiologías. En este estudio constatamos que los niveles de ARNm de la IL-6, la IL-1 β y el TNF- α se elevaron de forma muy significativa en el hígado de los conejos infectados en comparación con el grupo control, y que el tratamiento con melatonina resultó en una disminución significativa en la expresión de todas estas citoquinas (IL-6, RHDV+Mel10: -52%, RHDV+Mel20: -71%; IL-1 β , RHDV+Mel10: -21%, RHDV+Mel20: -32%; TNF- α , RHDV+Mel10: -35%, RHDV+Mel20: -67%) respecto al grupo RHDV. El RHDV aumentó así mismo la expresión hepática de la proteína C reactiva (CRP), efecto que fue evitado en parte en los conejos infectados tratados con melatonina (RHDV+Mel10: -63%, RHDV+Mel20: -62%) (Figura 27).



Figura 27. Contenido de ARNm de IL-1 β , IL-6, TNF- α y CRP en los diferentes grupos de estudio expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios ± E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.

La activación de las MMPs, en particular MMP-9, es un evento crítico en el desarrollo del FHF experimental. En los animales infectados por el RHDV se observa una marcada sobreexpresión hepática de MMP-9; sin embargo en los animales tratados con melatonina la expresión disminuye significativamente de forma dependiente de la dosis (RHDV+Mel10: -60%, RHDV+Mel20: -83%) respecto al grupo RHDV (Figura 28).



Figura 28. Contenido de ARNm de MMP-9 en los diferentes grupos de estudio expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios \pm E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.

4.5 Efecto del RHDV y la melatonina sobre la apoptosis hepática

La activación de la caspasa 3 es el evento final común iniciado por múltiples estímulos que inducen a la apoptosis. La infección por el RHDV se tradujo en un marcado aumento de la actividad de la caspasa 3. El tratamiento con melatonina consiguió evitar esta activación de manera dependiente de la concentración (RHDV+Mel10: -27%, RHDV+Mel20: -43%). Con el fin de comprobar *in situ* la activación de la caspasa 3, se determinó la proteína por inmunohistoquímica. En los animales control no se detectó expresión de caspasa 3, mientras que en el hígado de conejos infectados se observó un gran número de hepatocitos marcados. Se observó una reducción significativa y dependiente de la concentración en la expresión hepática de la caspasa 3 en conejos infectados tratados con melatonina respecto a los no tratados (Figuras 29 y 30).



Figura 29. Actividad hepática de la caspasa 3 en los diferentes grupos de estudio. La actividad se expresa como unidades de fluorescencia por miligramo de proteína por minuto de incubación. Valores medios \pm E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.



Figura 30. Detección inmunohistoquímica de la expresión hepática de la caspasa 3 en los diferentes grupos de estudio. Aumentos: 100x.

La poli-ADP-ribosa-polimerasa (PARP)-1 es una enzima nuclear catalítica, que es activada cuando hay interrupciones en la cadena de ADN. La familia de la caspasa 3 es el principal responsable de su división en un fragmento de 85 kDa, cuya presencia confirma que las células están sufriendo apoptosis. En nuestros experimentos, los análisis de Western blot mostraron

una marcada proteólisis de PARP-1 en animales afectados por la RHD, que fue parcialmente abolida por la melatonina (RHDV+Mel10: -40%, RHDV+Mel20: -61%) (Figura 31).



Figura 31. Expresión hepática de la proteína PARP-1. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios \pm E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.

Para identificar las vías de la apoptosis inhibidas por la melatonina, examinamos diferentes marcadores tanto de la vía intrínseca como de la vía extrínseca. Bax es un miembro de la familia Bcl-2 que favorece la apoptosis, contribuyendo a la liberación de proteínas que se encuentran en el espacio intermembrana, como el Cit-c, que a su vez activa la caspasa 9, activando la cascada de caspasas, que finaliza en la caspasa 3. Nuestros datos muestran un aumento significativo en la expresión de Bax en los conejos infectados por el RHDV, que fue reducido por la melatonina en una manera significativa y dependiente de la concentración (RHDV+Mel10: -38%, RHDV+Mel20: -55%) (Figura 32).



Figura 32. Expresión hepática de la proteína Bax. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios \pm E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.

Además la infección por RHDV también se tradujo en un aumento en la expresión del Cit-c y la melatonina redujo estos valores de forma significativa y dependiente de la concentración (RHDV+Mel10: -26%, RHDV+Mel20: -55%) (Figura 33). Este efecto fue acompañado por cambios paralelos en la actividad de la caspasa 9 (RHDV+Mel10: -35%, RHDV+Mel20: -58%) (Figura 34).



Figura 33. Expresión hepática del citocromo-c. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios ± E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.



Figura 34. Actividad hepática de la caspasa 9 en los diferentes grupos de estudio. La actividad se expresa como unidades de fluorescencia por miligramo de proteína por minuto de incubación. Valores medios \pm E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.

La formación del poro mitocondrial provocada por Bax, que permite la liberación del Cit-c, es impedido por Bcl-2. La expresión de esta proteína antiapoptótica no se vio afectada de manera significativa en animales

infectados por el RHDV, pero aumentó en los animales infectados que recibieron melatonina (RHDV+Mel10: +96%, RHDV+Mel20: +98%), lo que resulta en una disminución de la relación Bax/Bcl-2. La inhibición por el RHDV de la expresión de Bcl-xL, otra proteína antiapoptótica de la familia Bcl-2, también fue prevenida de manera significativa por la melatonina (RHDV+Mel10: +93%, RHDV+Mel20: +103%) (Figura 35).



Figura 35. Expresión hepática de las proteínas Bcl-2 y Bcl-xL. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios ± E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.

Para determinar si la melatonina podía revertir los efectos que tiene el RHDV sobre la vía extrínseca de la apoptosis, se midió la expresión de Fas-L y de la caspasa 8, la caspasa iniciadora clave de la apoptosis mediada por Fas-L y TNF-α. Los datos obtenidos indican que el significativo incremento que se produce en la expresión de la caspasa 8 en los animales infectados por el RHDV, fue evitado por la dosis mayor de la melatonina (RHDV+Mel10: -8%, RHDV+Mel20: -20%). Sin embargo, aunque la expresión de Fas-L se

incrementó notablemente en los conejos infectados, la melatonina no produjo cambios significativos (RHDV+Mel10: -1%, RHDV+Mel20: -3%) (Figuras 36 y 37).



Figura 36. Actividad hepática de la caspasa 8 en los diferentes grupos de estudio. La actividad se expresa como unidades de fluorescencia por miligramo de proteína por minuto de incubación. Valores medios \pm E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.



Figura 37. Expressión hepática de Fas-L. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios \pm E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.

En la vía extrínseca de la apoptosis, la unión de TNF-α a su receptor TNF-R1 es también responsable del procesamiento de la caspasa 8. Los datos obtenidos indican que la infección por RHDV indujo un aumento significativo en la expresión de TNF-R1, aumento que fue disminuido por la melatonina (RHDV+Mel10: -34%, RHDV+Mel20: -40%) (Figura 38). Además, la expresión de la proteína inhibidora de la caspasa 8, c-FLIP, fue significativamente inhibida por la infección por RHDV, y este efecto fue prevenido por la melatonina en una forma dependiente de la concentración (RHDV+Mel10: +152%, RHDV+Mel20: +391%) (Figura 39).



Figura 38. Expresión hepática de TNF-R1. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios \pm E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.



Figura 39. Expresión hepática de la proteína c-FLIP. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios \pm E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.

JNK es una proteína que aumenta la muerte celular inducida por TNF-α, a través del procesamiento de c-FLIP. El tratamiento con melatonina también inhibió el aumento en la expresión de p-JNK observado en los animales infectados con el RHDV (RHDV+Mel10: -39%, RHDV+Mel20: -40%) (Figura 40).



Figura 40. Expresión hepática de la quinasa JNK y su forma fosforilada. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios ± E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.

4.6 Efecto del RHDV y la melatonina en la regeneración hepática

Los factores de crecimiento tienen un gran potencial para estimular la respuesta regenerativa del hígado, y así, mejorar la evolución y el resultado de enfermedades tanto agudas, como crónicas. En el hígado de los conejos infectados por el RHDV se encontró una disminución significativa en la expresión de ARNm de HGF y su receptor, c-Met. En comparación con este grupo, los animales infectados y tratados con melatonina mostraron una mayor expresión hepática de ambos factores respecto a los no tratados (HGF, RHDV+Mel10: +51%, RHDV+Mel20: +81%; c-Met, RHDV+Mel10: +48%, RHDV+Mel20: +67%) (Figura 41). El efecto positivo de la melatonina también se tradujo en un aumento en la concentración de proteína, tanto de HGF como de c-Met (HGF, RHDV+Mel10: +51%, RHDV+Mel20: +224%) (Figura 42).



Figura 41. Contenido de ARNm del factor de crecimiento HGF y su receptor c-Met en los diferentes grupos de estudio expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios \pm E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.



Figura 42. Expresión hepática del factor de crecimiento HGF y su receptor c-Met. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios \pm E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.

La expresión de ARNm de PDGF-B y PDGFR-β en el tejido hepático se redujo de forma marcada en los conejos afectados por la RHD, mientras que el tratamiento con melatonina fue capaz de estimular significativamente la expresión de los mismos, especialmente con la dosis más alta (PDGF-B,

RHDV+Mel10: +59%, RHDV+Mel20: +59%; PDGFR-β, RHDV+Mel10: +9%, RHDV+Mel20: +61%). Por otra parte, la melatonina previno la disminución significativa en la expresión de EGF, EGFR, VEGF y VEGFR que produjo el RHDV (EGF, RHDV+Mel10: +27%, RHDV+Mel20: +42%; EGFR, RHDV+Mel10: +36%, RHDV+Mel20: +75%; VEGF, RHDV+Mel10: 47+%, RHDV+Mel20: +144%; VEGFR, RHDV+Mel10: +50%, RHDV+Mel20: +217%) (Figura 43).



Figura 43. Contenido de ARNm de los factores de crecimiento PDGF-B, EGF y VEGF y sus receptores PDGFR- β , EGFR y VEGFR en los diferentes grupos de estudio expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios ± E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.

Para profundizar en los mecanismos protectores de la melatonina se analizó por Western Blot la fosforilación de la proteína quinasa ERK1/2 y del factor de transcripción nuclear STAT-3, dos moléculas implicadas en la regulación de la proliferación de los hepatocitos. Los resultados obtenidos muestran que en los conejos infectados y tratados con melatonina, los niveles de las formas fosforiladas de ERK1/2 y STAT-3 aumentan significativamente respecto a los animales no tratados (p-ERK1/2, RHDV+Mel10: +35%, RHDV+Mel20: +73%; p-STAT-3, RHDV+Mel10: +187%, RHDV+Mel20: +204%) (Figura 44).



Figura 44. Expresión hepática de las proteínas ERK y STAT-3 y sus formas fosforiladas. El panel superior muestra los Western blots representativos de los diferentes grupos de estudio. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios \pm E.E.M. de 3-6 conejos. ^aP<0,05 con respecto al grupo Control. ^bP<0,05 con respecto al grupo RHDV. ^cp<0,05 con respecto al grupo RHDV+Mel10.

5 DISCUSIÓN

5.1 Efecto del RHDV y la melatonina sobre diversos parámetros plasmáticos de daño hepático

Los datos obtenidos en el presente estudio indican que la melatonina previno el daño hepático en animales infectados experimentalmente con el RHDV, induciendo una inhibición significativa y dependiente de la concentración tanto de la ALT como de la AST. La administración de melatonina produjo una inhibición significativa del estrés oxidativo y un aumento principales defensas antioxidantes. de las Además las concentraciones de glucosa de los animales infectados y tratados con melatonina, no disminuyeron de forma tan brusca como en los animales infectados sin tratamiento.

5.2 Efecto del RHDV y la melatonina sobre el estrés oxidativo y las defensas antioxidantes

La concentración hepática de los TBARS así como la relación entre las concentraciones de GSSG y GSH, dos indicadores fundamentales del estado de oxido-reducción celular, se incrementaron significativamente en los animales infectados con el RHDV. El estrés oxidativo es un hallazgo común en diferentes modelos animales de FHF, y parece jugar un papel importante en la patogénesis de la enfermedad, contribuyendo a la muerte celular apoptótica (San Miguel y cols., 2006). El GSH actúa como neutralizador de diferentes RL y es una de las principales defensas contra el estrés oxidativo (Crespo y cols., 2008).

En este estudio detectamos una disminución significativa en los niveles de GSH en los animales infectados por el RHDV, que puede deberse a la utilización excesiva de este antioxidante para la eliminación de los RL, a una menor síntesis o una mayor degradación del mismo para generar cisteína, necesaria en otros tejidos potencialmente dañados (San Miguel y cols., 2006).

Sin embargo, en los conejos infectados y tratados con melatonina se observó una reducción significativa tanto de la relación GSSG/GSH como de la concentración de TBARS. Estos resultados confirman estudios previos que indican que la melatonina es capaz de regular y/o mantener la concentración intracelular de glutatión y prevenir el estrés oxidativo (Reiter y cols., 2000).

Algunas enzimas antioxidantes tales como la SOD y la GPx, protegen a las células contra el estrés oxidativo, mediado por el daño celular, mediante la conversión de los radicales tóxicos a productos finales no tóxicos. La SOD, tanto la forma Cu-Zn SOD citosólica como la Mn-SOD mitocondrial, convierten rápidamente el O₂. en H₂O₂. La GPx puede descomponer H₂O₂ formando agua, y la GST cataliza el ataque nucleofílico, por el GSH, de compuestos polares que contienen un átomo electrofílico. Cualquier factor que inhiba la actividad de las enzimas antioxidantes puede conducir a la acumulación de RL y al posterior al daño oxidativo de macromoléculas biológicas (Mauriz y cols., 2007).

Se ha sugerido que la regulación de las enzimas antioxidantes por la melatonina se produce junto con su protección contra el elevado estrés oxidativo en diversas situaciones experimentales (Rodríguez y cols., 2004). Por lo tanto, la melatonina aumenta la actividad de la GPx y al mismo tiempo reduce el daño de los RL y la concentración de GSSG en el hígado de conejos tratados con el antioxidante. En este estudio se ha podido constatar que la expresión y la actividad de la Cu, Zn-SOD y la GPx citosólica y mitocondrial aumentan en paralelo con una disminución de la concentración de TBARS y una baja relación GSSG/GSH, como ocurre en el hígado de ratas de avanzada edad tratadas con melatonina induce aumentos del GSH hepático y de la actividad de la SOD en ratas tratadas con benzopireno (Murawska-Cialowicz y cols., 2011) o previene la disminución de la actividad de la GPx y el aumento de las concentraciones de los TBARS en ratas tratadas con tetracloruro de carbono (Hong y cols., 2009).

En nuestros experimentos la actividad y la expresión del ARNm de las enzimas antioxidantes GPx, GST y Mn-SOD se redujo significativamente en el hígado de los conejos con RHD, y estos cambios fueron evitados por la administración de melatonina de manera dependiente de la concentración. Aunque el mecanismo molecular implicado en la regulación de la expresión de las enzimas antioxidantes por la melatonina no está del todo claro, se ha encontrado que en ratas tratadas con dimetilnitrosamina, la melatonina aumenta la expresión de enzimas antioxidantes en paralelo a la activación del factor Nrf2 (Jung y cols., 2009).

El Nrf2 es un factor de transcripción nuclear que juega un papel fundamental por su unión al ARE en la región promotora de una serie de genes que codifican para enzimas antioxidantes y destoxificantes en varios tipos de células y tejidos. En condiciones normales el Nrf2 se encuentra en el citoplasma unido a otra proteína, Keap1. Dicha unión fomenta la permanente degradación de Nrf2 por el proteosoma, por lo que el control primario de su función radica principalmente en su distribución subcelular, más que en la síntesis "de novo". Se ha sugerido que el sistema Nrf2-Keap1 contribuye a la protección contra varias patologías como el cáncer, la toxicidad hepática y la inflamación entre otras (Sriram y cols., 2009; Sugimoto y cols., 2010). El Nrf2 se expresa de forma constitutiva en la mayoría de las células, pero no se encuentra libre y activo de forma continua, sino únicamente en situaciones de estrés oxidativo.

Cuando las células están expuestas a distintos inductores, el Nrf2 se separa de Keap1 y se transloca al núcleo, donde forma un heterodímero con una pequeña proteína denominada Maf. Este heterodímero activa los genes dependientes de la región ARE que mantienen la homeostasis del estado de oxido-reducción celular. En el presente estudio se observó que el tratamiento con melatonina resultó en un aumento de los niveles de la proteína el Nrf2 e indujo su translocación nuclear y su unión a las regiones ARE en el hígado de los animales con RHD. Nuestros datos apoyan resultados previos, en los que se indica que Nrf2 puede jugar un papel importante en la protección contra el daño hepático inducido por tetracloruro de carbono (Xu y cols., 2008), alcohol (Wu y cols., 2012), o por la esteatohepatitis nutricional (Sugimoto y cols., 2010).

La melatonina, al dar lugar a la estabilización y la translocación de Nrf2 al núcleo, puede promover la transcripción de genes diana como GPx, GST y Mn-SOD. El mantenimiento de la concentración del GSH hepático en conejos infectados tratados con melatonina también podría estar relacionado con la activación del Nrf2, porque hay estudios en los que se pone de manifiesto que ratones que carecen de Nrf2 exhiben menores niveles de GSH y de glutamato cisteína ligasa, la enzima limitante en la síntesis de GSH; además, también se ha demostrado que la sobreexpresión del Nrf2 induce el promotor de la actividad glutamato cisteína ligasa humana (Chan y cols., 2001; Lu, 2009).

La activación del Nrf2 por la melatonina podría estar mediada por diversos mecanismos. La actividad del Nrf2 está normalmente inhibida en el citosol por la unión específica a la proteína Keap1 lo que dificulta la translocación nuclear de Nrf2. Por lo tanto, los factores que estimulan la disociación del dímero pueden activar la vía de señalización del Nrf2. Nuestros datos indican que la concentración de la proteína Keap1, al igual que en otras investigaciones en animales que recibieron diferentes antioxidantes, se mantuvo inalterada en los animales que recibieron melatonina, lo que se tradujo en un aumento del cociente Nrf2/Keap1 (Patel y Maru, 2008; Sriram y cols., 2009). Esto puede indicar que en el tratamiento con melatonina, Nrf2 se disocia de Keap1 y, por lo tanto, se transloca al núcleo.

Un resultado interesante de nuestro estudio fue el aumento en la expresión y actividad de la Cu, Zn-SOD en conejos infectados con el RHDV, un efecto que no fue observado tras la administración de melatonina. Aunque hay estudios que indican que el factor Nrf2 regula la expresión de la Cu, Zn-SOD en respuesta a diferentes compuestos (Na y cols., 2008; Park y Rho, 2002), también se ha demostrado que los cambios en la vía del Nrf2 no siempre van

acompañados de cambios en la expresión de esta enzima (Liu y cols., 2009). Por otra parte, se ha demostrado que la Cu, Zn-SOD y Mn-SOD pueden ser reguladas de distintas formas y que la Mn-SOD, pero no la Cu, Zn-SOD, es inducida por citoquinas proinflamatorias, cuya acción biológica está mediada por el NF-κB (Sugino y cols., 1998). En estudios anteriores recientes, nuestro grupo ha comprobado que tanto la vía de señalización del NF-κB como la expresión del TNF- α se encuentran significativamente inducidas en el hígado de conejos infectados con el RHDV (García-Lastra y cols., 2010).

En resumen, los datos obtenidos proporcionan evidencias de que algunos de los efectos beneficiosos de la melatonina en el modelo animal de FHF inducido por el RHDV, pueden atribuirse a la activación de la vía de señalización del Nrf2 y el consecuente aumento de las enzimas antioxidantes GPx, GST y Mn-SOD. Estos resultados apoyan estudios previos que indican que la activación de Nrf2 puede ser una nueva estrategia para prevenir o mejorar lesiones hepáticas de orígenes diferentes. Debido a que el FHF se asocia con un riesgo elevado de resultados letales y el trasplante de hígado no siempre está disponible de manera oportuna, la inhibición del estrés oxidativo y/o la intervención directa sobre las vías que conducen a aumentar las defensas antioxidantes podrían ser dianas moleculares para el posible uso terapéutico de la melatonina, lo que contribuye a una ayuda temporal a la espera de un trasplante de hígado.

5.3 Efectos del RHDV y la melatonina sobre la inflamación hepática

El TLR4 es una proteína transmembrana que existe principalmente en los macrófagos, como las células de Kupffer del hígado, y que juega un papel importante en enfermedades infecciosas e inflamatorias (O'Neill, 2007). La proteína nuclear HMGB-1 tiene funciones de tipo citoquina y se libera, bien de forma pasiva durante el daño hepático y la necrosis celular, o bien de forma activa durante la activación de células inmunes (Yang y cols., 2010). Estudios

previos indican que en el modelo de isquemia/reperfusión y en la lesión hepática provocada por concanavalina se produce la unión de HMGB-1 a TLR4 (Gong y cols., 2010; Kang y cols., 2011). Además, se ha señalado que la deleción del gen de TLR4 puede paliar la lesión hepática en modelos experimentales de daño hepático agudo (Zhai y cols., 2004), y se sabe que el tratamiento con E5564, un antagonista de TLR4, mejora la tasa de supervivencia global de las ratas con FHF inducido por D-galactosamina y lipopolisacárido (Kitazawa y cols., 2010). Los datos del presente estudio confirman que la vía de HMGB-1-TLR4 puede contribuir al daño inflamatorio en los conejos infectados por el RHDV, un efecto que podría ser mediado, en parte, por la activación y la translocación nuclear de NF-kB que se ha demostrado que se produce en este modelo animal de FHF (García-Lastra y cols., 2010). Por otra parte, nuestros resultados apoyan un efecto protector y anti-inflamatorio de la melatonina, ya que tanto la expresión hepática de HMGB-1 como TLR4 se vieron significativamente reducidas en los animales infectados que recibieron melatonina.

La regulación de la activación del complemento está mediada por una familia de receptores del complemento y proteínas reguladoras, entre las que destaca DAF (Hourcade y cols., 2000), una molécula que recientemente se ha demostrado que es capaz de reducir el daño inflamatorio mediado por ambas vías, la del complemento y la vía de señalización del TLR (Kaikkonen y cols., 2010). Los virus, bacterias y parásitos han desarrollado muchas estrategias eficaces para evitar la activación del complemento. De este modo, algunos virus encapsulados como el virus de la inmunodeficiencia humana, secuestran pasivamente a DAF en sus envueltas, lo cual inhibe la capacidad del hospedador para regular el complemento (Saifuddin y cols., 1997). En los conejos infectados por RHDV, constatamos una disminución muy significativa en la expresión de DAF, un efecto que fue prevenido por la administración de melatonina. La activación del complemento y de los sistemas de TLR resultan en la producción de varias moléculas biológicamente activas que contribuyen a

la inflamación, incluyendo citoquinas y CRP, que desempeñan un papel clave en la lesión hepática aguda de diversas etiologías (Antoniades y cols., 2008). Como era de esperar, en nuestro estudio los niveles de ARNm de genes inflamatorios como IL-1 β , IL-6, TNF- α y CRP se elevaron de manera marcada en los conejos infectados. El tratamiento con melatonina resultó en una reducción significativa en la expresión de todas estas moléculas, lo que confirma la acción anti-inflamatoria de la hormona.

Además, se observó que el tratamiento con melatonina produjo una reducción significativa de la fosforilación de JNK, una MAPK que se encuentra sobreexpresada en los animales infectados que no recibieron melatonina. JNK es un mediador de los procesos inflamatorios mediante la inducción de la expresión de citoquinas proinflamatorias (Paik y cols., 2003), y la inducción de JNK representa un factor estratégico en la muerte celular a través de la vía de señalización del TNF-α (Papa y cols., 2009). Por lo tanto, se considera que JNK desempeña un papel clave en el daño hepático agudo. En nuestro estudio esta cadena de acontecimientos parece ser inhibida por la administración de melatonina. Estos resultados coinciden por investigaciones previas que indican que la supresión de la vía de JNK contribuye a los efectos beneficiosos de la melatonina en el modelo de isquemia/reperfusión hepática (Liang y cols., 2009).

La activación de las MMPs, en particular MMP-9, es un acontecimiento crítico en el desarrollo de FHF experimental, y recientemente se ha demostrado que la inducción de MMP-9 mediada por la IL-1, juega un papel patógeno fundamental en los modelos de FHF al promover la degradación de matriz extracelular, que conduce a la apoptosis de los hepatocitos y provoca la afluencia y la activación de las células polimorfonucleares que aumentan el daño tisular (Yan y cols., 2010). Hemos constatado que la melatonina reduce la expresión de MMP-9 en los conejos infectados por el RHDV Al igual que ocurre con la cardiotrofina-1 en este modelo animal de FHF (Tuñón y cols., 2011). Nuestros datos confirman la inhibición de MMP-9 por la melatonina que se ha

observado en diversas condiciones que causan estrés oxidativo (Swarnakar y cols., 2011).

5.4 Efectos del RHDV y la melatonina sobre la apoptosis hepática

El papel protector de la melatonina ha sido demostrado en numerosos modelos de daño hepático, al inhibir o aminorar el estrés oxidativo (Kormaz y cols., 2009; Liang y cols., 2009; Tahan y cols., 2009). Además, en los últimos años se ha observado un comportamiento antiapoptótico de la melatonina en células no tumorales, contribuyendo al efecto protector en diferentes enfermedades hepáticas (Molpeceres y cols., 2007; Kim y Lee, 2008; Hu y cols., 2009; Koh, 2011). En nuestro estudio el incremento observado tanto en la expresión y actividad de la caspasa 3, como en el fragmento de 85 kDa resultante de la proteólisis de PARP-1, muestran un incremento significativo de la apoptosis provocado por el RHDV, confirmando resultados obtenidos anteriormente en este modelo animal (San Miguel y cols., 2006). La melatonina fue capaz de prevenir este incremento de una forma dependiente de la concentración, protegiendo contra el daño hepático en los conejos infectados con el RHDV.

La apoptosis se regula por dos vías diferentes, la intrínseca y la extrínseca, y en los hepatocitos estas dos vías están íntimamente relacionadas. En la activación de la vía intrínseca existen varias señales proapoptóticas, como el estrés oxidativo, que cambian directa o indirectamente la permeabilidad de la membrana mitocondrial, provocando la salida de proteínas intermembrana al citosol. Entre estas proteínas se encuentra el Cit-c, que al salir al citosol provoca la activación de la caspasa 9 y, posteriormente, de la caspasa 3 (Mauriz y cols., 2008).

Existen muchas proteínas intracelulares, especialmente de la familia Bcl-2, que regulan la vía intrínseca de la apoptosis, al expresar señales pro- o
antiapoptóticas. Esta familia consta de miembros proapoptóticos (Bax) y antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL) (Fabregat y cols., 2007). Los resultados obtenidos en este estudio indican que la melatonina induce una disminución significativa del nivel de proteína de Bax, acompañado de un incremento tanto de Bcl-2, como de Bcl-xL, resultando en una disminución de la relación entre miembros pro y antiapoptóticos de la familia Bcl-2. Esto podría contribuir a la disminución en el nivel citosólico de Cit-c y la consecuente activación de la caspasa 9. De hecho se ha indicado que la melatonina es capaz de antagonizar la activación de la vía intrínseca de la apoptosis alterando los niveles de Bax/Bcl-2, sobre todo gracias a la neutralización de RL (Radogna y cols., 2008; Maity y cols., 2009).

La vía extrínseca de la apoptosis se inicia con la activación de receptores de membrana por ligandos específicos. El complejo de muerte, TNF-R1, activa la caspasa 8, que provoca la rotura y activación de la procaspasa 3 y la cascada de apoptosis celular (Mauriz y cols., 2008). La caspasa 8 es un iniciador de la vía extrínseca de la apoptosis mediada por Fas-L, en la que la unión de la proteína Fas a su ligando induce la cascada apoptótica. En este trabajo, tanto la expresión de la caspasa 8 como de Fas-L aumentó en el grupo de animales infectados por el RHDV; mientras que la melatonina produjo una disminución significativa de la caspasa 8 y no tuvo efecto sobre la expresión de Fas-L. Este controvertido resultado podría explicarse, al menos en parte, por el hecho de que la caspasa 8 también se puede activar por la cascada de caspasas que se inicia por la salida del Cit-c al citosol (Cowling y Donward, 2002).

Otra posibilidad es que la caspasa 8 también se activa por un aumento en el nivel de la citoquina proinflamatoria TNF- α y la unión a su receptor, TNF-R1, en la superficie celular. Esta citoquina es uno de los mediadores celulares que conllevan un daño apoptótico en distintos modelos animales de FHF (Tuñón y cols., 2003), y se ha observado que la melatonina es capaz de reducir los elevados niveles de TNF- α en un modelo en ratones tratados con D- galactosamina/lipopolisacárido (Wang y cols., 2007). Nuestro grupo de investigación ya había constatado anteriormente un incremento significativo de TNF- α en animales infectados por el RHDV (García-Lastra y cols., 2010), y los resultados obtenidos en este trabajo demuestran un incremento en la expresión de TNF-R1, incremento que fue abolido por la administración de melatonina. Así pues, el efecto antiapoptótico de la melatonina en este modelo podría ser, al menos en parte, asociado a la inhibición de la apoptosis mediada por TNF- α . Además el TNF- α contribuye a la sobreproducción de EROs en la mitocondria y la despolarización de su membrana, contribuyendo a su acción proapoptótica (Takai y cols., 2007). Se ha demostrado que la disminución en los niveles de glutatión hace a los hepatocitos más sensibles a la apoptosis mediada por TNF- α , mientras que los antioxidantes han mostrado un efecto protector frente a esta muerte celular (Matsumaru y Kaplowitz, 2003).

Otro hallazgo interesante de nuestro trabajo ha sido la constatación de que el RHDV parece inhibir la expresión de c-FLIP. c-FLIP es un inhibidor de la caspasa 8, cuya degradación es un evento clave en la muerte celular inducida por Fas-L y TNF-α (González-Rodríguez y cols., 2009). La quinasa JNK también es capaz de activar esta vía a través del procesamiento de c-FLIP (Chang y cols., 2006), y ya se ha comprobado que la activación de esta proteína es un evento esencial en el daño hepático causado por el RHDV (García-Lastra y cols., 2010). El hecho de que la melatonina inhiba la expresión de la forma fosforilada de JNK (p-JNK) de forma dependiente de la concentración, podría explicar la disminución de c-FLIP, y la consiguiente inhibición de la caspasa 8 en la vía extrínseca de la apoptosis. De hecho, en estudios previos se ha demostrado que la deficiencia de JNK, o el tratamiento con sus inhibidores, bloquea la ubiquitinación de c-FLIP, haciendo a los ratones resistentes en diferentes modelos de FHF (González-Rodríguez y cols., 2009).

5.5 Efecto del RHDV y la melatonina sobre la regeneración hepática

El FHF surge como resultado de una lesión hepatocelular extensa que daña la capacidad del hígado para regenerarse; sin embargo, no existen terapias disponibles capaces de estimular la regeneración. Nuestros datos indican que la melatonina es capaz de desencadenar la expresión de factores de crecimiento y sus receptores, que tienen un enorme potencial para provocar la regeneración del hígado y para mejorar el manejo y el resultado de una enfermedad hepática aguda o crónica (Mizuno y Nakamura, 2007). La ruta de señalización del HGF/c-Met, principal factor de crecimiento de los hepatocitos y de su receptor, es una vía de supervivencia de gran importancia en el hígado, y que funciona durante el desarrollo, la homeostasis y la regeneración del órgano (Sánchez y Fabregat, 2010). Ratones knock-out para c-Met y HGF específicamente en hígado muestran un deterioro de la respuesta regenerativa hepática (Phaneuf y cols., 2004).

El factor de crecimiento derivado de las plaquetas, PDGF-B está dotado de actividad citoprotectora y promueve la proliferación de hepatocitos (Borkham-Kamphorst y cols., 2008). En pacientes con FHF, se ha demostrado que los niveles plasmáticos de PDGF-B se correlacionan positivamente con la supervivencia (Takayama y cols., 2011), lo que sugiere que la regulación positiva de este factor de crecimiento puede favorecer la recuperación.

También se ha demostrado un papel crítico del EGFR en la proliferación de hepatocitos en las fases iniciales de la regeneración del hígado, gracias a los estudios en ratones con una deficiencia en la formación hepática de EGFR (Natarajan y cols., 2007).

Por último, la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF, aumenta notablemente durante la regeneración hepática inducida, bien por hepatectomía o bien por el daño por drogas (Shimizu y cols., 2001), y se ha sugerido que la señalización del VEGF facilita la recuperación del hígado de la

toxicidad del paracetamol, promoviendo la restauración sinusoidal (Kato y cols., 2011).

Pues bien, nuestros resultados indican que el tratamiento con melatonina activa la expresión de todos estos factores de crecimiento. Este hallazgo coincide con los resultados recientes en los que se ha indicado que la cardiotrofina-1 induce un aumento paralelo en la supervivencia y en la expresión de PDGF-B, EGF, PDGFR y c-Met en los conejos infectados por el RHDV (Tuñón y cols., 2011).

La actividad reparadora del hígado se asocia con una respuesta celular que conduce a la regeneración del tejido y que implica la activación coordinada de varias vías de señalización, tales como MAPKs y vías de factores de transcripción nuclear (Fausto y cols., 2006). La MAPK ERK1/2 se utiliza para favorecer la replicación de los virus ARN (Pleschka, 2008), y en nuestros experimentos los niveles de la forma fosforilada de ERK se incrementaron significativamente en los conejos infectados por el RHDV. Sin embargo, ERK1/2 también interviene en una serie de procesos celulares que incluyen la diferenciación celular, el crecimiento y la supervivencia (Pearson y cols., 2001). La activación de ERK es una vía clave de señalización implicada en la regulación de la proliferación celular, tanto de los hepatocitos, como de las células endoteliales, y se ha indicado que la activación de esta vía aparece después de la hepatectomía (Talarmin y cols., 1999; Bustos y cols., 2003). Anteriormente se había observado que la melatonina mantiene la activación de esta vía de promoción de la supervivencia en células estresadas con rayos UV (Luchetti y cols., 2009), y en este estudio la melatonina promueve un efecto similar después de la infección por RHDV.

El papel del factor de transcripción STAT3 en la regeneración hepática también ha sido ampliamente investigado. La rápida activación de STAT3 ha sido bien documentada durante la regeneración hepática tras una hepatectomía o una lesión hepática (Sakuda y cols., 2002; Wang y cols., 2010),

y se sabe que el HGF, el EGF, y las proteínas virales de la hepatitis también pueden activar STAT3 en los hepatocitos (Wang y cols., 2010). La fosforilación del STAT3 activa la transcripción de muchos genes diana que juegan un papel importante en la promoción de la supervivencia de los hepatocitos y la regeneración del hígado, protegen contra el daño hepatocelular y contra la necrosis hepática asociada a la inflamación (Michalopoulos, 2007). Hemos detectado en este estudio la falta de activación de STAT3 en los conejos infectados por el RHDV, que como hemos indicado con anterioridad, probablemente está mediada por la sobreexpresión del supresor de la señalización de citoquinas (SOCS)3, lo que contribuye a la inhibición de la respuesta regenerativa en los animales infectados por el RHDV (García-Lastra y cols., 2010). Por lo tanto, el aumento de la expresión de STAT3 producido por la administración de melatonina en este modelo animal de FHF podría ser en parte, responsable de sus efectos beneficiosos.

En general, nuestros resultados indican que la melatonina previene la inflamación y mejora la regeneración en la hepatitis aguda producida por el RHDV. Por lo tanto, los resultados de la presente investigación y de estudios previos proporcionan evidencias de que la melatonina podría tener aplicación clínica en el manejo de los pacientes con FHF, y sugieren que los mecanismos inflamatorios y regenerativos podrían ser blancos del potencial uso terapéutico de la melatonina y contribuir al apoyo temporal a la espera de un trasplante de hígado.

CONCLUSIONES

6.1 Primera conclusión

El virus de la enfermedad hemorrágica del conejo induce un fallo hepático fulminante que se acompaña de un aumento significativo en la actividad de genes relacionados con el estrés oxidativo, la inflamación y la apoptosis. Además, el virus provoca una reducción significativa en la expresión de los mediadores y vías de señalización más importantes de la regeneración hepática. Estos datos confirman que esta enfermedad es un modelo animal adecuado para el estudio de nuevas opciones terapéuticas del fallo hepático humano.

6.2 Conclusión segunda

Los datos obtenidos en este estudio indican que la melatonina previene el estrés oxidativo y la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes inducida por el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo. Este efecto podría atribuirse a la activación de la vía de señalización del factor de transcripción Nrf2, responsable de la activación de los genes involucrados en la respuesta antioxidante.

6.3 Conclusión tercera

La administración de melatonina reduce la apoptosis producida por el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo al aumentar la expresión de proteínas antiapoptóticas y disminuir la expresión de proteínas proapoptóticas, la salida del citocromo c de la mitocondria y la activación de la caspasa 3. Todo ello podría estar relacionado, al menos en parte, con la disminución del estrés oxidativo que produce la melatonina, lo que implicaría un menor daño de diversos orgánulos, como la mitocondria, que regulan la liberación y expresión de diferentes mediadores de la apoptosis.

6.4 Conclusión cuarta

El virus de la enfermedad hemorrágica del conejo provoca una significativa reducción en la expresión de los mediadores y vías de señalización más importantes de la regeneración hepática. El tratamiento con melatonina aumenta la expresión de los factores de crecimiento hepáticos y sus receptores y estimula la fosforilación de la quinasa ERK y del factor de transcripción STAT3, dos moléculas de señalización claves involucradas en la regulación de la proliferación de los hepatocitos.

6.5 Conclusión final

Los resultados obtenidos confirman el papel protector de la melatonina frente al estrés oxidativo, la apoptosis y la inflamación hepática producidos por el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo. Además, el tratamiento con melatonina induce el proceso de regeneración hepática, un evento clave para una posible recuperación de un fallo hepático fulminante.

Dado que el fallo hepático fulminante está asociado con una alta mortalidad y que el trasplante ortotópico no siempre es posible en el momento adecuado, la inhibición del estrés oxidativo, de la apoptosis y de la inflamación, así como la inducción de la regeneración hepática, podrían ser dianas moleculares del uso terapéutico de la melatonina en el fallo hepático fulminante constituyendo un soporte temporal en espera de un trasplante o de una recuperación espontánea.

7 SUMMARY

7.1 Introduction and Objectives

Fulminant hepatic failure (FHF) is a rare, but frequently catastrophic consequence of sever liver injury. The entity was originally defined by Trey and Davidson (Trey and Davidson, 1970) and arises from many causes. After abrupt loss of hepatic metabolic and immunological function, it leads to hepatic encephalopathy, coagulopathy, and, in many cases, progressive multiorgan failure. There are many causes of FHF, which vary with geographic region (Ichai et al., 2011). The most frequent causes worldwide include viral hepatitis, particularly viral hepatitis A (VHA) and viral hepatitis B (VHB), medication overdose, idiosyncratic drug reactions, ingestion of toxins and metabolic disorders. In addition to these known etiologies, indeterminate causes of FHF account for large proportion of cases of FHF (Riordan and Williams, 2000). A reasonable estimate of the survival rate of FHF is 20-25% of patients, except for paracetamol poisoning which has a recovery rate of almost 50% of cases (Bernal, 2003).

Liver transplantation has been shown to be the most effective therapy, but the procedure is limited by shortage of donor organs. Although a number of clinical trials testing different liver assist devices are underway, these systems alone have no significant effect on patient survival and are only regarded as useful approach to bridge patients with FHF to liver transplantation. As a result, reproducible experimental animal models resembling FHF clinical conditions are still needed to improve our insight into the metabolic and physiological derangements of FHF and to facilitate the development of new therapeutic modalities.

At present, the most commonly used surgical and chemical models possess significant limitations and do not accurately reflect the pattern of human disease in FHF. Moreover, viral hepatitis remains an important cause of FHF in many parts of the world, but the use of infective agents to induce experimental FHF have so far had very limited success (Tuñón et al., 2007). Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) is a member of the *Caliciviridae* family that causes in wild and domestic rabbits an acute highly fatal disease that was first reported over two decades ago. The disease is characterized by severe necrotizing hepatitis and disseminated intravascular coagulation, neurologic symptoms and rapid evolution to death within 48 to 72 h after infection in about 90% of the cases. Hepatic damage plays a central pathogenic role and is histologically similar to fatal viral hepatitis causing FHF in humans. It has been shown by data on animal survival, clinical features, histological data, changes in blood chemistry and intracranial pressure monitoring that RHD fulfils many of the requirements of an animal model for FHF (García-Lastra et al., 2010).

Oxidative damage due to oxidative stress is the failure of the cell's defence against the deleterious effects of harmful agents by means of its numerous autoprotective mechanisms. Oxidative stress is a common pathogenic mechanism contributing to the initiation and progression of hepatic damage in cases of inflammatory liver disorders, including FHF, which presents a marked inflammatory response. The mechanisms responsible for liver injury in acute severe viral hepatitis leading to FHF are complex and include the virus cytopathic effect and a vigorous inflammatory response, resulting in extensive hepatocellular cell damage that exceeds the liver capacity to regenerate (Tuñón et al., 2011). Accumulating evidence suggests that massive oxidative stress plays a major role in the pathogenesis of FHF. The mitochondria permeability transition is quite sensitive to the redox state of the mitochondria and oxidative stress triggers permeability transition pore opening, when reactive oxygen species are present (Paradies et al., 1999).

Programmed cell death or apoptosis is an essential process for tissue homeostasis. Hepatocyte apoptosis is a common mechanism to many forms of liver disease (Pessayre et al., 1999). FHF occurs when the extent of hepatocyte death exceeds the regenerative capacity of the liver (Rutherford and Chung, 2008). The mode of liver cell death that is predominantly induced in FHF, apoptosis or necrosis, is still controversial and presumably determined by the etiology, duration, and magnitude of liver injury.

Many growth factors, cytokines, transcription factors, and intracellular signalling pathways have been implicated in regulating liver damage and regeneration (Bernal et al., 2010). However, although some therapeutic approaches to FHF have tried to block the inflammatory response and to enhance proliferative pathways (Harrison et al., 1990), pathogenic therapies able to attenuate liver cell damage and stimulate regeneration are still lacking.

Melatonin is a derivative of serotonin, which is produced in many body tissues, including the pineal gland, retina and the gastrointestinal tract. It plays a fundamental role in the neuroinmmune-endocrine system, but is also a potent antioxidant (Reiter et al., 2000) with therapeutic potential in numerous cell and animal models of liver injury. Thus, it has been demonstrated that melatonin administration prevents liver injury induced by ischemia/reperfusin (Keem and 2008) alcoholic al.. D-Lee, injury (Hu et 2009) or galactosamine/lipopolysaccharide administration (Wang et al., 2007).

Thus, in this study we investigated the effects of two different melatonin concentrations on liver injury, markers of oxidative stress and antioxidant defences and its potential antiinflamatory, antiapoptotic and regenerative effects on the animal model of FHF caused by the RHDV.

7.2 Materials and methods

Virus and experimental model

Nine-week-old male New Zealand white rabbits were kept in a climatized room at 21°C, with a 12 h light cycle. They were given a standard dry rabbit food and water *ad libitum*. Rabbits were injected intramuscularly with 2x10⁴ hemagglutination units of an RHDV isolate. We have previously reported that

during experimental RHDV infection biochemical data and expression of genes involved in injury and regeneration change remarkably at 36 h-48 h postinfection (pi). It was thus decided to study effects of melatonin by sacrificing a group of control rabbits (n=6) and batches of infected animals at 36 hours post infection (hpi). The rabbits were divided in five groups: Group control (n=6) received 4 ml of vehicle at 0, 12 and 24 h. Group control+Mel (n=6) received 20 mg/kg body weight i.p. at 0, 12 and 24 hpi. Group RHDV (n=6) Group RHDV+Mel10 (n=6) received 10 mg/Kg body weight i.p. at 0, 12 and 24 h. Group RHDV+Mel20 (n=6) received 20 mg/kg body weight i.p. at 0, 12 and 24 h. Melatonin (Sigma, St Louis, MO, USA) was dissolved into absolute ethanol and further dilutions were made in saline. The final concentration of ethanol was 5%.

The research was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki (2000) of the World Medical Association. All study protocols were reviewed and approved by the University of Leon Animal Care Committee.

Blood chemistry

Laboratory determinations included alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). Analyses were carried out in the Hospital of Leon Clinical Chemistry Laboratory using standard techniques.

Biochemical markers of oxidative stress

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

and 500 µL were diluted with 4.5 mL of buffer. Two spectrofluorometry cuvettes per sample were prepared with 1.8 mL phosphate-EDTA buffer, 100 µL supernatant and 100 µL O-phthalaldehyde. After incubating for 15 minutes at 4°C, a spectrofluorometric reading was obtained at an excitation wavelength of 350 nm and an emission wavelength of 420 nm. To find the percentage of glutathione corresponding to oxidised and reduced forms, 500 µL of the sample supernatant was incubated with 20 µL 4-vinylpyridine for 30 minutes; to this mixture 4.5 mL of 0.1 N NaOH was added. A 100 µL portion of this mixture was then processed as described above to determine GSSG. GSH was obtained by subtracting GSSG from total glutathione, and molecular ratio GSSG/GSH was calculated.

The amount of aldehydic products generated by lipid peroxidation was quantified by measuring the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). For this purpose a final amount of 3 mg protein per sample was assayed. The samples were incubated at 90°C for 30 minutes after adding 500 μ L of 0.37% thiobarbituric acid in 15% trichloroacetic acid, then centrifuged at 4°C at 2,000 g for 15 minutes. Spectrophotometric absorbance was determined in the supernatant at 535 nm.

Activities of antioxidant enzymes

For measuring liver enzyme activities samples were homogenized at 4°C and 750 g for 15 min in an ice-cold medium containing 250 mM mannitol, 70 mM sucrose, and 2 mM EDTA (pH 7,4). Mitochondria were isolated by centrifugation of the supernatant at 12,000 g for 15 min. The mitochondrial pellet was washed twice in isolation medium by centrifugation at 12,000 g for 15 min and finally diluted to contain approximately 100 mg mitochondrial protein per mL. The supernatant fraction of the first 12,000 g centrifugation was centrifuged again at 105,000 g for 60 min, and the supernatant was retained as cytosol. Superoxide dismutase (SOD) was assayed in cytosolic and

mitochondrial extracts according to Misra and Fridovich (1972). The assay of glutathione peroxidase (GPx) was carried out according to Flohe and Günzler (1985). Glutathione-S-transferase (GST) was determined according to Habig et al (1974).

Real-time RT-PCR

Total RNA was obtained by using a Trizol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and quantified with a Nanodrop. Residual genomic DNA was removed by incubating RNA with RQ1 RNase-free DNase (Promega, Madison, WI, USA). RNA integrity was confirmed by formaldehyde gel electrophoresis. First-standard cDNA was synthesized using High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The negative control (no transcriptase control) was performed in parallel. Real-time PCR was performed under optimal condition using the following PCR amplification mixture (20 μ L total): 2x QuantiTect SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) and 0.3 μ M forward and reverse primers. The sets of PCR primers used for the analysis of the mRNA abundance are specified in Tables 2 and 3. Each assay included a no-template control and an RT negative control. Relative changes in gene expression levels were determined using the 2- $\Delta\Delta$ CT. The cycle number at which the transcripts were detectable was normalized to the cycle number of GADPH gene detection, referred to as Δ CT.

Western blot analysis

Western blot (Laemmli, 1970) analyses were performed on cytosolic and nuclear extracts. Nuclear extracts were prepared from liver homogenates as described previously. Briefly, 100 mg of liver from all animals were homogenized in 5×10^{-4} L of buffer A (0.01 M Hepes- KOH pH 7.9, 250 g/L

Glycerol, 0.420 M NaCl, 0.0015 M MgCl₂, 2x10⁻⁴ M EDTA, 5x10⁻⁴ M DTT, 2x10⁻⁴ M PMSF) and a phosphatase inhibitor cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) to disrupt extracellular matrix and cellular membranes. Homogenates were centrifuged at 1,000 g for 10 min at 4°C. The pellet was resuspended in 2.5x10⁻⁴ L of buffer B (0.02 M NaCl Hepes- KOH pH 7.9, 250 g/L glycerol, 0.42 M NaCl, 15x10⁻⁴ M MgCl₂, 2x10⁻⁴ M EDTA, 5x10⁻⁴ M DTT, 2x10⁻⁴ M PMSF) homogenized and incubated at 4°C for 30 min. Cellular debris was removed by centrifugation at 14,000 g for 15 min at 4°C. The supernatant fraction containing DNA binding proteins was recollected and stored at -80°C in aliquots until use. Cytosolic extracts were prepared by liver tissue homogenization in 0.25 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris and a phosphatase and protease inhibitor cocktail (Roche). The homogenate was centrifuged at 4°C for 30 min at 13,000 g. The supernatant fraction was recollected and stored at -80°C in aliquots until use. Protein concentration of the cytosolic and nuclear liver fractions was measured by the Bradford assay (Bradford, 1976). Equal amounts of protein (10-50 µg) were separated by 9-12% sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis for 1.5 h at 100 V and then blotted on polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Amersham Pharmacia, Little Chalfont, UK). The membranes were then blocked with 5% non-fat dry milk in phosphate buffered saline buffer containing 0.05% Tween 20 (PBST) for 1 hour at room temperature and probed overnight at 4°C with polyclonal anti- Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2), Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-xL, Fas ligand (Fas-L), Poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1), cytochrome c, lamin-B, (Toll-like receptor 4) TLR4, decay-accelerating factor (DAF), hepatocyte growth factor (HGF), c-Met (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), Janus kinase (JNK), phospho-JNK, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT-3), phospho-STAT-3, extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), phospho-ERK1/2 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), c-FLIP and tumor necrosis factor receptor-1 (TNF-R1) (Abcam, Cambridge, UK), with PBST containing 3% non-fat dry milk. Equal loading of protein was demonstrated by

probing the membranes with a rabbit anti actin or lamin-B polyclonal antibody (1:200 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or rabbit anti- β -actin polyclonal antibody (Sigma, St Louis, MO, USA; 1:1,000 dilution). After washing with PBST, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with secondary HRP conjugated antibody (Dako, Glostrup, Denmark, 1:5,000), and visualized using ECL detection kit (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden). The density of the specific bands was quantified with an imaging densitometer (Scion Image, Maryland, MA, USA).

Immunohistochemistry

Tissue samples were recovered, fixed in 10% buffered formalin, and embedded in paraffin for immunohistochemistry studies (Sternberg et al., 1970). Sections (4 μm), samples were dewaxed and hydrated through graded ethanols, cooked in 25 mM citrate buffer, pH 6.0, in a pressure cooker for 10 minutes, transferred into boiling deionized water and let to cool for 20 min. Tissue sections were then treated with 3% hydrogen peroxide to inactivate endogenous peroxidase activity. The slides were incubated with rabbit polyclonal anti Nrf2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or caspase-3 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) overnight at 4°C, followed by incubation with biotinylated second antibody (Biotinylated Anti-Rabbit IgG; Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 1 hour at room temperature. After 45 minutes of avidin-biotin amplification (ABC Standard; Vector Laboratories), samples were incubated with the substrate 0.1% 3′, 3′diaminobenzidine (DAB/Ni Substrate; Vector Laboratories) at room temperature for 10 min. The nuclei were lightly outer stained with haematoxylin in solution.

Electrophoresis mobility shift assay (EMSA)

Nuclear extract from rabbit livers were prepared from liver homogenates as described previously. The oligonucleotides harbouring the antioxidant response element (ARE) consensus sequence were labelled by T4 polynucleotide kinase. Binding reactions included 10 µg of nuclear protein in incubation buffer (50 mM Tris-HCI pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM mercaptoethanol, 20% glycerol and 1 µg poly(dl-dC)). After 15 min on ice, the labelled oligonucleotide (30,000 cpm) was added and the mixture incubated 20 min at room temperature. For competition studies, 3.5 pmol of unlabelled Nrf2 oligonucleotide (competitor) or labelled Nrf2 oligonucleotide mutate (noncompetitor) were mixed 15 min before the incubation with the labelled oligonucleotide. The mixture was electrophoresed through a 6% polyacrylamide gel for 90 min at 150 volts. The gel was then dried and autoradiographed at -70°C overnight. The density of the specific bands was quantified with an imaging densitometer (Scion Image, Maryland, MA, USA).

Caspase activities

Caspase activities were measured by the Hasegawa method (Hesegawa et al., 1996). Lysates were prepared by homogenizing liver tissue in 0,25 mM sucrose, 1mM EDTA, 10 mM Tris and a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The lysates were then centrifuged at 14,000 g for 10 min at 4°C and supernatants (50 µg protein) were incubated for 1 hour at 37°C in HEPES containing 100 µM concentration of the specific 7-amino-4-methylcoumarin fluorogenic substrates N-acetyl-L-aspartyl-Lacid (Ac-DEV-AMC), glutamyl-L-valil-L-aspartic amide 7-amino-4trifluoromethylcoumarin N-acetyl-L-isoleucyl-L-glutamyl-L-threonyl-L-aspartic acid amide (Ac-IETD-AFC) and 7-amino-4-methylcoumarin N-acetyl-L-leucyl-Lglutamyl-L-histidyl-L-aspartic acid amide (Ac-LEHD-AMC) for caspase-3, -8 and -9 respectively (Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA). Cleavage of the

fluorescent caspase-3, -8 and -9 substrates were monitored using fluorescence microtiter plate reader (Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) at excitation/emission wavelengths of 360/460 nm for caspase-3, 400/505 nm for caspase-8 and 380/505nm for caspase-9 activity assays respectively. Activity was expressed as fluorescence units per milligram of protein per min of incubation.

Statistical analysis

Results are expressed as mean values±SEM. Data were compared by analysis of variance (ANOVA); when the analysis indicated the presence of a significant difference, the means were compared with the Newmann Keuls test. Significance was accepted at p<0.05. Values were analyzed using the statistical software SPSS+ vrs.19.0 (IBM, Chicago, Illinois, EE.UU.).

7.3 Results

Effects of melatonin on blood chemistry changes and markers of oxidative stress in rabbits with RHDV induced FHF

AST and ALT activity increased in the group of animals infected with the RHDV when compared to the control animals. These effects were significantly prevented by melatonin treatment in a concentration-dependent manner (ALT, RHDV+Mel10: -49%, RHDV+Mel20 -79%; AST, RHDV+Mel10: -55%, RHDV+Mel20: -85%) (Figure 13). Melatonin also prevented the decrease on glucose plasma concentrations caused by the experimental infection with the RHDV (Figure 14).

In our experiments, both the TBARS concentration and the GSSG/GSH ratio concentration were analyzed in the different experimental groups as

markers of oxidative stress. Liver concentration of TBARS significantly increased in RHDV infected rabbits (+70%), while values decreased in animals receiving melatonin (RHDV+Mel10: -47%; RHDV+Mel20: -40%) and did not significantly differ from values in the control group (Figure 13). Experimental infection also induced a significant increase in the GSSG/GSH ratio (+137%). GSH concentration decreased significantly in infected animals (-35%), while there was a significant increases in GSSG concentration (+53%). These effects were partially prevented by melatonin treatment at 10 mg/kg (GSSG/GSH: -34%, GSH: +44%) and abolished by melatonin administration at 20 mg/kg (GSSG/GSH: -57%, GSH: +71%; GSSG: -27%) (Figure 16).

Effects of melatonin on expression and activity of antioxidant enzymes in rabbits with RHDV induced FHF

Effects of RHDV infection and melatonin on the activities of both Mn-SOD and Cu,Zn-SOD were studied. A significant decrease in the Mn-SOD activity (-44%) was found in infected animals. Melatonin was able to significantly prevent this change at both 10 mg/kg (+48%) and 20 mg/kg (+62%). Cu,Zn-SOD activity increased by 40% in RHDV infected rabbits. This effect was partially or totally prevented by melatonin at 10 mg/kg (-19%) or 20 mg/kg (-26%), respectively. GPx and GST activity were significantly lowered by the RHDV infection (-75% and -16%, respectively). Changes in both enzymes were prevented by melatonin in a concentration-dependent manner (GPx, RHDV+Mel10: +181%, RHDV+Mel20: +264%; GST, RHDV+Mel10: +9%, RHDV+Mel20: +13 %) (Figure 17).

To determine whether changes in the activity of antioxidant enzymes could be regulated at a transcriptional level, we examined mRNA expression in the different experimental groups. A reduction of Mn-SOD, GPx and GST mRNA levels was found in RHDV infected rabbits. We detected also a significant increase of Cu,Zn-SOD mRNA with infection. Melatonin treatment in

infected animals resulted in a significant prevention of those changes that was concentration-dependent (Figure 18).

To determine involvement of Nrf2 in the regulation of antioxidant enzyme genes we measured protein levels by Western blot. Data obtained indicate that Nrf2 protein increased in both the cytosol and the nucleus in liver cells of RHVD-infected rabbit treated with melatonin. This effect reached a higher extent in animals receiving melatonin at 20 mg/kg (Figure 19). Immunohistochemical data indicated the presence of positively-stained hepatocytes scattered throughout the parenchyma in liver sections from infected rabbits, with a marked increase of Nrf2 expression in livers of RHDV rabbits treated with melatonin (Figure 20). Keap1 levels also were measured by western blot and no significant differences were found (Figure 21).

We then moved to investigate whether nuclear translocation of Nrf2 was accompanied by binding to AREs in its target genes. EMSA data indicate that the ARE-binding capacity of Nrf2 was significantly increased in a dosedependent manner in liver nuclear extracts from melatonin-treated animals compared to RHDV infected animals (Figure 22).

Effects of melatonin on liver inflammatory reaction in rabbits with RHDV induced FHF

Activation of TLR4 may initiate cascades of proinflammatory mediators thus aggravating hepatocellular damage in severe forms of acute liver disease. We found that melatonin administration significantly dampened the elevation of TLR4 mRNA expression (RHDV+Mel10: -20%, RHDV+Mel20: -57%) and TLR4 protein concentration (RHDV+Mel10: -32%, RHDV+Mel20: -36%) that occurred in livers from RHDV infected rabbits (Figures 21 and 22). Liver mRNA expression of high-mobility group protein B1 (HMGB-1), whose binding to TLR4 mediates its effects in hepatic injury, enhanced markedly in untreated-infected

rabbits while it was maintained at significantly lower values in animals which received melatonin therapy (RHDV+Mel10: -81%, RHDV+Mel20: -83%) (Figure 23). An opposite effect was observed for DAF, a molecule involved in modulating the interaction between TLR signalling and complement. DAF protein concentration was strongly reduced in RHDV infection and melatonin administration prevented this effect (RHDV+Mel10: +196%, RHDV+Mel20: +110%) (Figure 26).

Proinflammatory cytokines have been shown to play a key role in acute liver injury of various etiologies. We found that mRNA levels of interleucin-6 (IL-6), IL-1 β , and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) were strongly elevated in RHDV infected livers compared to healthy controls, and that melatonin treatment resulted in a significant reduction in the mRNA expression of all these molecules (IL-6. RHDV+Mel10: -52%. RHDV+Mel20: -71%: IL-1β, RHDV+Mel10: -21%, RHDV+Mel20: -32%; TNF-α, RHDV+Mel10: -35%, RHDV+Mel20: -67%). C reactive protein (CRP) mRNA expression also increased significantly following experimental infection and this effect was partially prevented by melatonin administration (RHDV+Mel10: -63%, RHDV+Mel20: -62%) (Figure 27). Activation of matrix metalloproteinases (MMPs), particularly MMP-9, is a critical event in the development of experimental FHF. We observed a marked hepatic overexpression of MMP-9 in RHDV infected animals: however, in the liver of RHDV infected rabbits that received melatonin, MMP-9 was markedly downregulated (RHDV+Mel10: -60%, RHDV+Mel20: -83%) (Figure 28).

Effects of melatonin on hepatic apoptosis in rabbits with RHDV induced FHF

Activation of caspase-3 is the common event initiated by multiple different stimuli that induce apoptosis. To determine whether caspase-3 was activated by RHDV infection, samples were incubated with a specific fluorigenic substrate whose cleavage indicated that infection resulted in a marked increase of caspase 3 activity. Treatment with melatonin prevented this activation in a concentration-dependent manner (RHDV+Mel10: -27%, RHDV+Mel20: -43%) (Figure 29). To further assess caspase-3 activation, immunohistochemistry for caspase-3 was performed. No positively stained cells appeared in control animals. However, in livers from RHDV infected rabbits, numerous positively stained hepatocytes were observed. A significant and concentration-dependent reduction in caspase-3 staining was detected in infected rabbits treated with melatonin (Figure 30). PARP-1 is a nuclear enzyme catalytically activated by DNA strand interruptions. Caspase-3 is mainly responsible for its cleavage into an 85 kDa fragment whose presence confirms that cells are undergoing apoptosis. In our experiments, western blot analysis demonstrated a marked PARP-1 proteolysis in animals with RHDV infection, which was partially or totally abolished by melatonin (10 or 20 mg/kg, respectively) (RHDV+Mel10: -40%, RHDV+Mel20: -61%) (Figure 31).

To identify the apoptotic pathways inhibited by melatonin, we examined different markers of the intrinsic and extrinsic pathways. Bax is a member of the Bcl-2 family that favours apoptosis, contributing to the release of the intermembrane mitochondrial cytochrome c, which in turn activates caspase-9 and downstream caspases, such as caspase-3. Our data demonstrate a significantly increased expression of Bax and cytochrome c in RHDV infected rabbits, which were prevented by melatonin in a concentration manner (Bax, RHDV+Mel10: -38%, RHDV+Mel20: -55%; cytochrome c, RHDV+Mel10: -26%, RHDV+Mel20: -55%) (Figures 32 and 33). These effects were accompanied by parallel changes in caspase-9 activity (RHDV+Mel10: -35%, RHDV+Mel20: -58%) (Figure 34). Formation by Bax of the mitochondrial pore that allows the release of cytochrome c is prevented by Bcl-2. Expression of this antiapoptotic

protein was not significantly impaired in animals with RHDV infection but increased in animals receiving melatonin (RHDV+Mel10: +93%, RHDV+Mel20: +103%), resulting in a decrease of the Bax to Bcl-2 ratio. Expression of Bcl-xL, another antiapoptotic protein of the Bcl-2 family, was also significantly induced by melatonin (RHDV+Mel10: +96%, RHDV+Mel20: +98%) (Figure 35).

To determine whether melatonin also has effects on the extrinsic pathway of apoptosis, the activity of caspase-8, the key initiator caspase mediating Fas-L- and TNF- α -induced apoptosis, was measured. Data obtained indicated a small although significant increase in RHDV infected animals, which was abolished by the higher concentration of melatonin (RHDV+Mel10: -8%, RHDV+Mel20: -19%) (Figure 36). However, although Fas-L expression was markedly increased in RHDV infected rabbits, no significant change appeared in the animals receiving melatonin (RHDV+Mel10: -1%, RHDV+Mel20: -3%) (Figure 37). In the extrinsic pathway of apoptosis, the binding of TNF- α to its receptor TNF-R1 is also responsible for the recruitment and processing of caspase-8. Data obtained indicate that RHDV infection induced a significant increase in TNF-R1 expression that was abrogated by melatonin (RHDV+Mel10: -34%, RHDV+Mel20: -40%) (Figure 38). Expression of the inhibitory protein of caspase-8, c-FLIP, was significantly inhibited by RHDV infection, and this effect was concentration-dependently prevented by melatonin (RHDV+Mel10: +152%, RHDV+Mel20: +391%) (Figure 39). Melatonin treatment also inhibited the increase in phospho-JNK expression observed in animals infected with the RHDV (RHDV+Mel10: -39%, RHDV+Mel20: -40%) (Figure 40).

Effects of melatonin on hepatic regeneration in rabbits with RHDV induced FHF

Growth factors have a huge potential to elicit liver regeneration and to improve the management and outcome of both acute and chronic hepatic disease. In the liver of RHDV infected rabbits we found a marked decrease in the mRNA expression of HGF and of its receptor c-Met. The infected rabbits treated with melatonin exhibited higher hepatic expression of HGF and of c-Met compared to untreated infected rabbits (HGF, RHDV+Mel10: +51%, RHDV+Mel20: +81%; c-Met, RHDV+Mel10: +48%, RHDV+Mel20: +67%) (Figure 41). Positive effect of melatonin was further confirmed by the increase in both HGF and c-Met protein concentration (HGF, RHDV+Mel10: +51%, RHDV+Mel20: +81%; c-Met, RHDV+Mel10: +234%, RHDV+Mel20: +224%) (Figure 42). mRNA expression of platelet-derived growth factor (PDGF-B) and its receptor (PDGFR-β) in liver tissue dropped intensely in RHDV infected rabbits, while those treated with melatonin showed significantly higher values of both PDGF-B and its receptor (PDGF-B, RHDV+Mel10: +59%, RHDV+Mel20: +59%; PDGFR-β, RHDV+Mel10: +9%, RHDV+Mel20: +61%, respectively). Furthermore, melatonin therapy prevented the significant decline of hepatic epidermal growth factor (EGF), epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA levels taking place in RHDV infection (EGF. RHDV+Mel10: +27%, RHDV+Mel20: +42%; EGFR. RHDV+Mel10: +36%, RHDV+Mel20: +75%; VEGF, RHDV+Mel10: +36%, RHDV+Mel20: +75%, respectively) (Figure 43).

To deepen into the mechanisms underlying melatonin protection, we examined by Western blot phosphorylation of ERK1/2 and STAT3, two key signalling molecules involved in the regulation of hepatocyte cell proliferation. Densitometric analysis revealed that relative level of phospho-ERK1/2 and phospho-STAT3 normalized to that of β -actin was significantly enhanced in rabbits treated with melatonin (phospho-ERK1/2, RHDV+Mel10: +35%, RHDV+Mel20: +73%; phospho-STAT3, RHDV+Mel10: +188%, RHDV+Mel20: +204%, respectively) (Figure 44).

7.4 Discussion

Data obtained in the present study indicate that melatonin prevented liver injury in animals experimentally infected with the RHDV, inducing a significant and concentration-dependent inhibition of both ALT and AST activities. Moreover, melatonin administration resulted in inhibition of oxidative stress and increased different antioxidant defences.

The liver concentration of TBARS and the molecular ratio between GSSG and GSH, sensitive indicators of the cellular redox state (Crespo et al., 2008), were significantly increased in animals with experimental infection by the RHDV. Oxidative stress is a common finding in different animal models of FHF, which appears to play an important role in the pathogenesis of the disease by contributing to apoptotic cell death (García-Lastra et al., 2010). The non-protein thiol, reduced glutathione (GSH) serves as a scavenger of different free radicals and is one of the major defences against oxidative stress. We found a decline in GSH levels in RHDV infected animals, which may be due to the excess utilization of this antioxidant for scavenging the free radicals, a lowered synthesis or increased degradation to generate cysteine required in other potentially damaged tissues (García-Lastra et al., 2010). We also observed a significantly reduction of the GSSG/GSH ratio and TBARS concentration in the liver in infected rabbits treated with melatonin. These results confirm previous studies indicating that melatonin is able to regulate and/or maintain the intracellular concentration of glutathione and to prevent oxidative stress (Reiter et al., 2000).

Antioxidant enzymes such as SOD and glutathione peroxidase protect the cells against oxidative stress mediated cellular injury by converting the toxic radicals to non-toxic end products. SOD, including Cu,Zn-SOD in cytosol and Mn-SOD in mitochondria, rapidly converts superoxide anion to H_2O_2 . The later can be converted to more harmful hydroxyl radicals in the presence of transition metals such as iron and copper. GPx can decompose H_2O_2 to water, and GST catalyzes the nucleophilic attack by reduced glutathione on nonpolar compounds that contain an electrophilic atom, often resulting in detoxification. Any factor that inhibits the activities of antioxidant enzymes may lead to accumulation of reactive oxygen species (ROS) and subsequently oxidative damage to biological macromolecules (García-Mediavilla et al., 2005). Antioxidant enzyme regulation by melatonin has been shown to occur concomitant with its protection against elevated oxidative stress in various experimental situations (Rodríguez et al., 2004). Thus, melatonin increases GPx activity and simultaneously reduces free radical damage and GSSG concentration in the liver of rats treated with lipopolysaccharide (Crespo et al., 2008). We have shown that expression and activity of Cu,Zn-SOD and cytosolic and mitochondrial GPx increase in parallel to a reduced concentration of TBARS and to a lowered GSSG/GSH ratio in the liver of aging rats treated with melatonin (Mauriz et al., 2007). It has also been found that melatonin induces rises in liver GSH and SOD activity in rats administered with benzo(a)pyrene or prevents the decrease of GPx activity and the rise in TBARS concentrations in rats treated with carbon tetrachloride (Hong et al., 2009; Tahan et al., 2009).

Nrf2 is a member of the cap "n" collar basic region-leucine zipper transcription factors which plays a critical role by binding to the ARE in the promoter region of a number of genes encoding for antioxidant and detoxifying enzymes in several types of cells and tissues (Reiter et al., 2000). Under basal condition, a negative regulator Keap1 represses Nrf2-dependent transcription. When cells are exposed to different inducers, Nrf2 escapes Keap1-mediated repression and translocates into the nucleus where it forms a heterodimer with a small Maf protein. The dimer then activates ARE-dependent gene expression to maintain cellular redox homeostasis (Rodríguez et al., 2004). In the present study it was observed that melatonin treatment resulted in increased protein levels of Nrf2 and induced its nuclear translocation and its antioxidant response element (ARE) binding in liver of animals with FHF. Our data support previous results indicating that Nrf2 play an important role in the protection against liver

injury induced by alcohol (Murawska-Cialowicz et al., 2009) or nutritional steatohepatitis (Li et al., 2009). Melatonin, by triggering the stabilization and translocation of Nrf2 into the nucleus may promote transcription of target genes such as GPx, GST and Mn-SOD. Maintenance of liver GSH concentration in infected rabbits treated with melatonin could also be related to Nrf2 activation, because there are reports that mice lacking Nrf2 exhibit lower GSH levels and lower gamma glutamate cysteine ligase, the rate-limiting enzyme in GSH synthesis, and overexpression of Nrf2 has been shown to induce the human gamma glutamate cysteine ligase promoter activity (Xu et al., 2008; Wu et al., 2012).

Different mechanisms could be responsible for the activation of Nrf2 induced by melatonin. The activity of Nrf2 is normally suppressed in the cytosol by specific binding to Keap1, which hampers the nuclear translocation of Nrf2. Therefore, factors which stimulate the dissociation of Nrf2 from its receptor may result in an activation of Nrf2 signalling (Sugimoto et al., 2010). Our data indicate that Keap1 protein concentration, similarly to previous reports in animals receiving antioxidants (Chan et al., 2001; Lu, 2009), remained unaltered in animals receiving melatonin, which resulted in an increased ratio Nrf2/Keap1. This may indicate that Nrf2, upon melatonin treatment, dissociates from Keap1 and hence translocates to the nucleus. It is also known that inhibition of upstream kinases responsible for phosphorylation of ERK1/2 attenuates the nuclear translocation of Nrf2 (Mauriz et al., 2007). We have recently reported that expression of phosphorylated ERK1/2 was absent at 48 h postifection in RHVD-infected rabbits (Ogeturk et al., 2008), and prevention of this effect by melatonin could also contribute to Nrf2 activation and subsequent upregulation of antioxidant enzyme genes.

An interesting finding from our study was the increase in the expression and activity of Cu,Zn-SOD in rabbits infected with the RHDV, an effect that was prevented by melatonin administration. Although there are reports that Nrf2 mediates the expression of Cu,Zn-SOD in response to different compounds (Park and Rho, 2002; Xu et al., 2009), it has also been shown that changes in the Nrf2 signalling pathway are not always accompanied by changes in Cu,Zn-SOD expression (Sriram et al., 2009). Moreover, it is known that Cu,Zn-SOD and Mn-SOD may be differentially regulated and that Mn-SOD but not Cu,Zn-SOD is highly induced by proinflammatory cytokines, whose biological action is mediated through NF- κ B (Sugino et al., 1998). We have recently reported that both the NF- κ B signalling pathway and the expression of TNF- α are significantly induced in the liver of RHDV infected rabbits (Ogeturk et al., 2008).

The transmembrane protein TLR4, which exists mainly in macrophages such as Kupffer cells of the liver, plays an important role in infectious and inflammatory disease states (O'Neill, 2007). HMGB-1 is a nuclear protein with cytokine-type functions that is passively release during cell injury and necrosis, or actively secreted during immune cell activation (Yang et al., 2010), and previous studies indicate that binding of HMGB-1 to TLR4 mediates its effects in hepatic ischemia/reperfusion and concavalin A-mediated hepatic injury (Gong et al., 2010; Kang et al., 2011). Gene deletion of TLR4 has been shown to palliate liver injury in experimental models of acute liver damage (Zhai et al., 2004), and it is known that treatment with E5564, a TLR4 antagonist, improves the overall survival rate of rats with D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced FHF (Kitazawa et al., 2010). Data in the present study confirm that the HMGB-1-TLR4 pathway may contribute to inflammatory damage in RHDV infected rabbit, an effect which could be partialy mediated by the activation and nuclear translocation of NF-kB previously shown to exist in this animal model of FHF (García-Lastra et al., 2010). Moreover, our results support an anti-inflammatory effect of melatonin, since both the liver expression of HMGB-1 and TLR4 were significantly reduced in infected animals that received melatonin. Regulation of complement activation is mediated by a family of complement receptor and regulatory proteins, including DAF (Hourcade et al., 2010), a molecule that has been recently shown to reduce the inflammatory injury mediated by both complement and TLR signalling (Kaikkonen et al., 2010). Viruses, bacteria, and

parasites have developed many efficient strategies to avoid clearance and destruction by complement. Thus, several enveloped viruses, such as human immunodeficiency virus, passively sequester DAF into the envelopes of newly emerging viruses, thereby inhibiting the host's ability to regulate complement (Saifuddin et al., 1997). This could also occur in RHDV infected rabbits, which show significantly decreased DAF expression, an effect prevented by administration of melatonin. Activation of complement and TLR systems results in the production of several biologically active molecules that contribute to inflammation, including cytokines and CRP, which play a key role in acute liver injury of various etiologies (Antoniades et al., 2008). As expected, we found that mRNA levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α and CRP were strongly elevated in RHDV infected rabbits. Treatment with melatonin resulted in a significant reduction in the expression of all these molecules, confirming the anti-inflammatory action of the hormone.

In addition, we observed that melatonin treatment elicited a significant reduction in the phosphorylation of JNK, a MAP kinase that was upregulated in untreated RHDV infected animals. JNK mediates inflammatory processes by inducing the expression of inflammatory cytokines (Paik et al., 2003), and the induction of JNK represents the strategic effector of cell death in the TNF- α -mediated signalling pathway (Papa et al., 2009). Therefore, JNK is thought to play a key role in acute hepatic injury. This chain of events appears to be inhibited by melatonin administration. Our results are supported by previous research indicating that suppression of the JNK pathway contributes to the beneficial effects of melatonin in hepatic ischemia/reperfusion injury (Liang et al., 2009).

Activation of matrix MMPs, particularly MMP-9, is a critical event in the development of experimental FHF, and it has been recently shown that IL-1mediated MMP-9 induction plays an essential pathogenic role in models of FHF by promoting degradation of extracellular matrix which leads to apoptosis of hepatocytes and triggers the influx and activation of polymorphs which enhance tissue damage (Yan et al., 2008). Similarly to the previously described downregulation of MMP-9 by cardiotrophin-1 in this animal model of FHF (Tuñón et al., 2011), we found that melatonin elicited in RHDV infected rabbits a reduction in the expression of MMP-9. Our data confirm the known inhibition of MMP-9 by melatonin under various conditions (Swarnakar et al., 2011).

In the last few years, there are data indicating that melatonin may behave as an antiapoptotic agent in nontumor cells, this effect contributing to protect against organ injury in different liver diseases (Molpeceres et al., 2007; Kim and Lee, 2008; Hu et al., 2009; Koh, 2011). Increases in both caspase-3 expression/activity and the 85 kDa fragment resulting from PARP-1 proteolysis now observed demonstrate, confirming previous data (San Miguel et al., 2006), a significant induction of apoptosis by RHDV infection. Effects reported were abrogated in a dose-dependent manner by melatonin, which thus protected against apoptotic damage in this viral model of FHF.

Apoptosis is regulated by two major pathways (intrinsic and extrinsic) that are not mutually exclusive but closely related in hepatocytes. In the intrinsic pathway, various apoptotic-inducing signals, particularly oxidative stress, directly or indirectly change mitochondrial membrane permeability and cause the release of mitochondrial intermembrane proteins, including cytochrome c, which leads to the activation of caspase-9 and downstream caspase-3 (Mauriz et al., 2008). Several intracellular proteins, in particular the Bcl-2 family, are important regulators of the intrinsic pathway, integrating death and survival signals. This family includes both pro-apoptotic (Bax) and antiapoptotic (Bcl-2 or Bcl-xL) proteins. Bcl-2 and Bcl-xL function to prevent cell death, whereas Bax accelerates the cell death signal (Fabregat et al., 2007). Our results indicate that melatonin induces a significant decrease in Bax protein level that is accompanied by increased Bcl-2 and Bcl-xL, resulting in a lowered ratio of proapoptotic to antiapoptotic proteins. This could in turn contribute to explain the reduced cytosolic level of cytochrome c and the lowered activity of caspase-9. We have previously found a similar effect induced by the antioxidant N-

acetylcysteine in this animal model of FHF (San Miguel et al., 2006), and there are reports that melatonin antagonizes the intrinsic pathway of apoptosis by altering Bax/Bcl-2 levels mostly via its radical scavenging activity (Radogna et al., 2008; Maity et al., 2009).

The extrinsic pathway of apoptosis is initiated by the activation of membrane-bound receptors by specific ligands. The death domain-associated proteins complex with pro-caspase-8, resulting in proteolytic cleavage and activation of pro-caspase-3 and the cellular apoptosis cascade (Mauriz et al., 2008). Caspase-8 is a key initiator caspase mediating Fas-L-induced apoptosis by this extrinsic pathway of apoptosis, in which the binding of Fas to Fas-L induces clustering and formation of death induces signalling complexes. In our study, both caspase-8 activity and Fas-L increased in animals with experimental RHDV infection; however, only caspase-8 activity was significantly reduced in infected rabbits treated with melatonin. This apparently controversial result could be partly explained by the fact that activation of caspase-8 can also occur as part of the cytochrome c-triggered caspase cascade (Cowling and Donward, 2002). It is known that caspase-8 processing in this system does not require Fas-L and may be experimentally induced by the addition of cytochrome c to the cytosol (Slee et al., 1999). Therefore, blocking of cytochrome c release by melatonin could contribute to the inhibition of caspase-8 activation. Activation of caspase-8 may also be triggered by increased generation of TNF-α and its binding to TNF-R1 death receptor on the cell surface. This cytokine is a major mediator leading to apoptotic liver injury in the different animal models of FHF (Tuñón et al., 2009), and it has been demonstrated that melatonin significantly reduces the elevation of TNF- α in D-galactosamine/lipopolysaccharide-treated mice (Wang et al., 2007). We have previously reported a marked increase in liver TNF-α in RHDV infected rabbits (García-Lastra et al., 2010), and present data indicate that TNF-R1 overexpression is abrogated by melatonin. Therefore, the antiapototic effect of melatonin in this experimental model of FHF may be, at least in part, associated with inhibition of TNF-α-mediated apoptosis. In

addition, TNF- α elicits the overgeneration of reactive oxygen species from mitochondria and depolarization of mitochondrial membrane that ultimately contribute to its proapoptotic action (Takai et al., 2007). Different studies have shown that glutathione depletion sensitizes hepatocytes to TNF- α -mediated apoptosis (Matsumaru and Kaplowitz, 2003), while antioxidants exert a cytoprotective effect (Harhaji et al., 2008). Blocking of TNF- α signalling could in consequence participate in the inhibition of the intrinsic pathway of apoptosis induced by melatonin.

An additional interesting finding is the inhibition of c-FLIP expression induced by RHDV infection. c-FLIP is an inhibitor of caspase-8, whose protein degradation is a key event in Fas-L and TNF-α-induced cell death (González-Rodríguez et al., 2009). It is known that JNK enhances TNF-α-induced death through the protesomal processing of c-FLIP (Chang et al., 2006), and we have shown in a previous study that the activation of JNK is an essential component in liver injury mediated by the RHDV (García-Lastra et al., 2010). Because melatonin inhibited phospho-JNK expression in a concentration-dependent manner, this would abrogate c-FLIP degradation and could be sufficient to inhibit caspase-8- activation in the extrinsic apoptotic pathway. In fact, previous studies have shown that JNK deficiency or treatment with a JNK inhibitor blocks c-FLIP ubiquitination and renders mice resistant in the different models of FHF (González-Rodríguez et al., 2009).

FHF arises as result of an extensive hepatocellular cell injury that damages the liver capacity to regenerate; however, pathogenic therapies able to stimulate regeneration are lacking. Our data indicate that melatonin triggers the expression of growth factors and growth factor receptors, which have a huge potential to elicit liver regeneration and to improve the management and outcome of both acute and chronic liver disease (Mizuno and Nakamura, 2007). The HGF/c-Met signalling pathway is a major survival pathway in liver that operates during liver development, homeostasis and regeneration (Sánchez and Fabregat, 2010). Liver specific c-Met and HGF conditional knock-out mice
show an impairment of the regenerative response (Phaneuf et al., 2004). PDGF-B is endowed with cytoprotective activity and promotes hepatocyte proliferation (Borkham-Kamphorst et al., 2008). In patients with FHF it has been shown that PDGF-B plasma levels correlate positively with survival (Takayama et al., 2011), suggesting that upregulation of this growth factor may foster recovery. Demonstration of a critical role for EGFR in hepatocyte proliferation during the initial phases of liver regeneration has recently been provided by generating mice with a liver-specific EGFR deficiency (Nataraja et al., 2007). Finally, VEGF expression increases markedly during liver regeneration induced either by partial hepatectomy or drug intoxication (Shimizu et al., 2001), and it has been suggested that VEGF signalling facilitates liver recovery from acetaminophen toxicity by promoting sinusoidal restoration (Kato et al., 2011). Melatonin therapy triggered the expression of the above growth factors. We have recently found that cardiotrophin-1 induces a parallel increase in survival and expression of PDGF-B, EGF, PDGFR and c-Met in RHDV infected rabbits (Tuñón et al., 2011). Thus, it is likely that upregulation of growth factors and their receptors by melatonin contribute to stimulate regeneration following severe acute liver injury.

Wound repair activity in the liver is associated with an orchestrated cellular response leading to tissue regeneration, which involves coordinated activation of signalling pathways, such as MAPKs and nuclear transcription factors pathways (Fausto et al., 2006). The MAPK ERK1/2 is employed to support the replication of RNA viruses (Pleschka, 2008), and in our experiments p-ERK levels were significantly increased in RHDV infected rabbits. However, ERK1/2 also mediates a number of cellular processes that include cell differentiation, growth, and survival (Pearson et al., 2001). ERK activation is a key signalling pathway involved in the regulation of both hepatocyte and endothelial cell proliferation, and activation of the ERK pathway has been shown after partial hepatectomy (Talarmin et al., 1999; Bustos et al., 2003).

-promoting pathway in UVB stressed cells (Luchetti et al., 2009), and promotes a similar effect following RHDV infection.

The role of the transcription factor STAT3 in liver regeneration has also been extensively investigated Rapid activation of STAT3 has been welldocumented during liver regeneration after partial hepatectomy or liver injury (Sakuda et al., 2002; Wang et al., 2010), and it is known that HGF, EGF, and hepatitis viral proteins can also activate STAT3 in hepatocytes (Wang et al., 2011). Phosphorylated STAT3 then activates the transcription of many target genes that play important roles in promoting hepatocyte survival and liver regeneration, protect against hepatocellular damage and reduce liver necrosisassociated inflammation (Michalopoulos, 2007). We have previously reported that lack of STAT3 activation, probably mediated by suppressor of cytokine signalling (SOCS)3 over-expression, contributes to the inhibition of the regenerative response in RHDV infected rabbits (García-Lastra et al., 2010). Increased expression of STAT3 could therefore we partly responsible for the beneficial effects of melatonin in this animal model of FHF.

8 CONCLUSIONS

8.1 First conclusion

Fulminant hepatic failure induced by the rabbit hemorrhagic disease virus is accompanied by a significant increase in the activity of genes related to oxidative stress, inflammation and apoptosis. Furthermore, the virus causes a significant reduction in the expression of mediators and signalling pathways leading to liver regeneration. These data confirm that this disease is a suitable animal model for studying new treatment options of human liver failure.

8.2 Second conclusion

Data from this study indicate that melatonin prevents oxidative stress and the decreased activity of antioxidant enzymes induced by the rabbit hemorrhagic disease virus. This effect could be attributed to activation of the signalling pathway of the transcription factor Nrf2 responsible of the activation of the genes involved in the antioxidant response.

8.3 Third conclusion

Administration of melatonin reduces apoptosis caused by the rabbit hemorrhagic disease virus by increasing the expression of antiapoptotic proteins and decreasing the expression of proapoptotic proteins, the output of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase 3. This could be related, at least in part, with the decrease of oxidative stress that melatonin produces, which would mean less damage to various organelles such as mitochondria, which regulate the release and expression of different mediators of apoptosis.

8.4 Fourth conclusion

The rabbit haemorrhagic disease virus causes a significant reduction in the expression of mediators and signalling pathways leading to liver regeneration. Melatonin treatment increases the expression of hepatic growth factors and their receptors and stimulate the phosphorylation of ERK kinase and transcription factor STAT3, two key signalling molecules involved in the regulation of the proliferation of hepatocytes.

8.5 Final conclusion

Results confirm the protective role of melatonin against oxidative stress, apoptosis and liver inflammation caused by the rabbit haemorrhagic disease virus. Furthermore, treatment with melatonin induces the regeneration process, a key event for a possible recovery from fulminant hepatic failure.

Because fulminant hepatic failure is associated with high mortality and orthotopic transplantation is not always possible in a timely fashion, inhibition of oxidative stress, inflammation and apoptosis, and induction of liver regeneration could be molecular targets of the therapeutic use of melatonin in fulminant hepatic failure, constituting a temporary support while awaiting transplantation or spontaneous recovery

9 BIBLIOGRAFÍA

Abboud G, Kaplowitz N. Drug-induced liver injury. Drug Saf 2007; 30:277-94.

Abe M, Reiter RJ, Orhii PB, Hara M, Poeggeler B. Inhibitory effect of melatonin on cataract formation in newborn rats: Evidence for an antioxidative role for melatonin. *J Pineal Res* 1994; 17:94-100.

Abrantes J, van der Loo W, Le Pendu J, Esteves PJ. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): A review. *Vet Res* 2012 Feb 10;43(1):12.

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

Acuna-Castroviejo D, Escames G, Lopez LC, Hitos AB, Leon J. Melatonin and nitric oxide: Two required antagonists for mitochondrial homeostasis. *Endocrine* 2005; 27:159-68.

Acuna-Castroviejo D, Martín M, Macias M, Escames G, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* 2001; 30:65-74.

Acuna-Castroviejo D, Pablos MI, Menendez-Pelaez A, Reiter RJ. Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993; 82:253-6.

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

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

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

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

Andrabi SA, Kim NS, Yu SW, Wang H, Koh DW, Sasaki M, Klaus JA, Otsuka T, Zhang Z, Koehler RC, et al. Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103:18308-13.

Andrabi SA, Sayeed I, Siemen D, Wolf G, Horn TF. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin. *FASEB J* 2004; 18:869-71.

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

Antoniades CG, Berry PA, Wendon JA, Vergani D. The importance of immune dysfunction in determining outcome in acute liver failure. *J Hepatol* 2008; 49:845-61.

Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martínou JC. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 2001; 76:11615-23.

Anton-Tay F, Ramirez G, Martínez I, Benitez-King G. In vitro stimulation of protein kinase C by melatonin. *Neurochem Res* 1998; 3:601-6.

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

Ariznavarreta C, Cardinali DP, Villanua MA, Granados B, Martín M, Chiesa JJ, Golombek DA, Tresguerres JA. Circadian rhythms in airline pilots submitted to long-haul transmeridian flights. *Aviat Space Environ Med* 2002; 73:445-55.

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

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

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

Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen LD, Poeggeler B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 1995; 26:497-502.

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

Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest 2005; 115:209-18.

Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbig MN, García-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodes J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000; 118:1149-56.

Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Brenner DA. Liver fibrogenesis: A new role for the renin-angiotensin system. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7:1346-55.

Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Lora JM, Al-Garawi A, Sole M, Colmenero J, Nicolas JM, Jimenez W, Weich N, et al. Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology* 2003; 125:117-25.

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

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

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

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

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

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

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

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

Bilir BM, Guinette D, Karrer F, Kumpe DA, Krysl J, Stephens J, McGavran L, Ostrowska A, Durham J. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl* 2000 Jan;6(1):32-40.

Bjornsson E. Hepatotoxicity associated with antiepileptic drugs. *Acta Neurol Scand* 2008; 118:281-90.

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

Boelsterli UA, Zimmerman HJ, Kretz-Rommel A. Idiosyncratic liver toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs: Molecular mechanisms and pathology. *Crit Rev Toxicol* 1995; 25:207-35.

Bohm F, Kohler UA, Speicher T, Werner S. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *EMBO Mol Med* 2010; 2:294-305.

Borkham-Kamphorst E, Kovalenko E, van Roeyen CR, Gassler N, Bomble M, Ostendorf T, Floege J, Gressner AM, Weiskirchen R. Platelet-derived growth factor isoform expression in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury. *Lab Invest* 2008; 88:1090-100.

Borowiak M, Garratt AN, Wustefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:10608-13.

Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J* 1998; 17:37-49.

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

Brainard GC, Hanifin JP, Greeson JM, Byrne B, Glickman G, Gerner E, Rollag MD. Action spectrum for melatonin regulation in humans: Evidence for a novel circadian photoreceptor. *J Neurosci* 2001; 21:6405-12.

Bredesen DE. Neural apoptosis. Ann Neurol 1995; 38:839-51.

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

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

Cardinali DP, Lynch HJ, Wurtman RJ. Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology* 1972; 91:1213-8.

Carlberg C, Wiesenberg I. The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5lipoxygenase: An unexpected relationship. *J Pineal Res* 1995; 18:171-8.

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

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

Chan K, Han XD, Kan YW. An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: Detoxification of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:4611-6.

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59:527-605.

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

Chang L, Kamata H, Solinas G, Luo JL, Maeda S, Venuprasad K, Liu YC, Karin M. The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell* 2006; 124:601-13.

Chen LD, Tan DX, Reiter RJ, Yaga K, Poeggeler B, Kumar P, Manchester LC, Chambers JP. In vivo and in vitro effects of the pineal gland and melatonin on [ca(2+) + Mg2+]-dependent ATPase in cardiac sarcolemma. *J Pineal Res* 1993; 14:178-83.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domaincontaining protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995; 81:505-12.

Clemmesen JO, Larsen FS, Kondrup J, Hansen BA, Ott P. Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* 1999; 29:648-53.

Cordoba J. Treatment of hepatic encephalopathy. *Gastroenterol Hepatol* 2002; 25:7-14.

Cordoba J, Crespin J, Gottstein J, Blei AT. Mild hypothermia modifies ammoniainduced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Gastroenterology* 1999; 116:686-93.

Cowling V, Downward J. Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: Absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death Differ* 2002; 9:1046-56.

Crespo I, García-Mediavilla MV, Almar M, González P, Tuñón MJ, Sanchez-Campos S, González-Gallego J. Differential effects of dietary flavonoids on reactive oxygen and nitrogen species generation and changes in antioxidant enzyme expression induced by proinflammatory cytokines in chang liver cells. *Food Chem Toxicol* 2008; 46:1555-69.

Cressman DE, Diamond RH, Taub R. Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration. *Hepatology* 1995; 1:1443-9.

Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev* 1998; 2:1551-70.

de la Mata M, Meager A, Rolando N, Daniels HM, Nouri-Aria KT, Goka AK, Eddleston AL, Alexander GJ, Williams R. Tumour necrosis factor production in fulminant hepatic failure: Relation to aetiology and superimposed microbial infection. *Clin Exp Immunol* 1990; 2:479-84.

Deacon S, Arendt J. Melatonin-induced temperature suppression and its acute phaseshifting effects correlate in a dose-dependent manner in humans. *Brain Res* 1995; 88:77-85.

Decker JF, Quay WB. Stimulatory effects of melatonin on ependymal epithelium of choroid plexuses in golden hamsters. *J Neural Transm* 1982; 55:53-67.

DeLeve LD, Kaplowitz N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 1991 Dec;52(3):287-305.

DeLeve LD, Kaplowitz N. Importance and regulation of hepatic glutathione. *Semin Liver Dis* 1990; 10:251-66.

Dempsey RJ, Kindt GW. Experimental acute hepatic encephalopathy: Relationship of pathological cerebral vasodilation to increased intracranial pressure. *Neurosurgery* 1982; 10:737-41.

Dickinson DA, Forman HJ. Glutathione in defense and signaling: Lessons from a small thiol. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 973:488-504.

Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 2002; 64:1019-26.

Diez-Fernandez C, Bosca L, Fernandez-Simon L, Álvarez A, Cascales M. Relationship between genomic DNA ploidy and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *Hepatology* 1993; 18:912-8.

Ding JW, Ning Q, Liu MF, Lai A, Leibowitz J, Peltekian KM, Cole EH, Fung LS, Holloway C, Marsden PA, et al. Fulminant hepatic failure in murine hepatitis virus strain 3 infection: Tissue-specific expression of a novel fgl2 prothrombinase. *J Virol* 1997; 71:9223-30.

Doggrell SA. Suramin: Potential in acute liver failure. *Expert Opin Investig Drugs* 2004; 13:1361-3.

Doria C, Nicotra G, D'Antona GM, Travali S, Messina A, Marino I, Gruttadauria G. Prognostic index of acute hepato-cellular damage. *Ann Ital Chir* 2007; 78:169-76.

Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005; 27:101-10.

Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci* 2003; 8:d1093-108.

Dubocovich ML, Takahashi JS. Use of 2-[125l]iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. *Proc Natl Acad Sci* U S A 1987; 84:3916-20.

Duff JP, Chasey D, Munro R, Wooldridge M. European brown hare syndrome in england. *Vet Rec* 1994; 134:669-73.

Ebisawa T, Karne S, Lerner MR, Reppert SM. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from xenopus dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:6133-7.

Eguchi S, Kamlot A, Ljubimova J, Hewitt WR, Lebow LT, Demetriou AA, Rozga J. Fulminant hepatic failure in rats: Survival and effect on blood chemistry and liver regeneration. *Hepatology* 1996; 24:1452-9.

Eguchi S, Lilja H, Hewitt WR, Middleton Y, Demetriou AA, Rozga J. Loss and recovery of liver regeneration in rats with fulminant hepatic failure. *J Surg Res* 1997; 72:112-22.

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

Eisenbach C, Sieg O, Stremmel W, Encke J, Merle U. Diagnostic criteria for acute liver failure due to wilson disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13:1711-4.

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

Eng FJ, Friedman SL. Transcriptional regulation in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21:385-95.

Escames G, Acuna-Castroviejo D, Lopez LC, Tan DX, Maldonado MD, Sanchez-Hidalgo M, Leon J, Reiter RJ. Pharmacological utility of melatonin in the treatment of septic shock: Experimental and clinical evidence. *J Pharm Pharmacol* 2006; 58:1153-65.

Escorsell A, Mas A, de la Mata M, Spanish Group for the Study of Acute Liver Failure. Acute liver failure in spain: Analysis of 267 cases. *Liver Transpl* 2007; 13:1389-95.

Fabregat I, Roncero C, Fernandez M. Survival and apoptosis: A dysregulated balance in liver cancer. *Liver Int* 2007; 27:155-62.

Fausto N. Liver regeneration. J Hepatol 2000; 32:19-31.

Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 2003;120:117-30.

Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. Hepatology 2006; 43:S45-53.

Feranchak AP, Tyson RW, Narkewicz MR, Karrer FM, Sokol RJ. Fulminant epsteinbarr viral hepatitis: Orthotopic liver transplantation and review of the literature. *Liver Transpl Surg* 1998; 4:469-76.

Fernandez MA, Albor C, Ingelmo-Torres M, Nixon SJ, Ferguson C, Kurzchalia T, Tebar F, Enrich C, Parton RG, Pol A. Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science* 2006; 313:1628-32.

Ferret PJ, Hammoud R, Tulliez M, Tran A, Trebeden H, Jaffray P, Malassagne B, Calmus Y, Weill B, Batteux F. Detoxification of reactive oxygen species by a

nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase cures acetaminophen-induced acute liver failure in the mouse. *Hepatology* 2001; 33:1173-80.

Filipponi F, Fabbri LP, Marsili M, Falcini F, Benassai C, Nucera M, Romagnoli P. A new surgical model of acute liver failure in the pig: Experimental procedure and analysis of liver injury. *Eur Surg Res* 1991; 23:58-64.

Fischer R, Baumert T, Blum HE. Hepatitis C virus infection and apoptosis. *World J Gastroenterol* 2007 Sep 28;13(36):4865-72.

FitzGerald MJ, Webber EM, Donovan JR, Fausto N. Rapid DNA binding by nuclear factor kappa B in hepatocytes at the start of liver regeneration. *Cell Growth Differ* 1995; 6:417-27.

Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105:114-21.

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

Fuchs A, Weissenbock H. Comparative histopathological study of rabbit haemorrhagic disease (RHD) and european brown hare syndrome (EBHS). *J Comp Pathol* 1992; 107:103-13.

Fukueda M, Ishizaki N, Hamada N, Kadono J, Kaieda M, Nakamura N, Komokata T, Sakata R. Porcine model of auxiliary partial orthotopic liver transplantation for acute liver failure. *Transplantation* 2006; 82:1312-8.

Galzin AM, Eon MT, Esnaud H, Lee CR, Pevet P, Langer SZ. Day-night rhythm of 5methoxytryptamine biosynthesis in the pineal gland of the golden hamster (mesocricetus auratus). *J Endocrinol* 1988; 118:389-97.

García JJ, Reiter RJ, Pie J, Ortiz GG, Cabrera J, Sainz RM, Acuna-Castroviejo D. Role of pinoline and melatonin in stabilizing hepatic microsomal membranes against oxidative stress. *J Bioenerg Biomembr* 1999; 31:609-16.

García-Lastra R, San-Miguel B, Crespo I, Jorquera F, Álvarez M, González-Gallego J, Tuñón MJ. Signaling pathways involved in liver injury and regeneration in rabbit hemorrhagic disease, an animal model of virally-induced fulminant hepatic failure. *Vet Res* 2010; 41:2.

García-Mediavilla MV, Sanchez-Campos S, González-Perez P, Gomez-Gonzalo M, Majano PL, Lopez-Cabrera M, Clemente G, García-Monzon C, González-Gallego J. Differential contribution of hepatitis C virus NS5A and core proteins to the induction of oxidative and nitrosative stress in human hepatocyte-derived cells. *J Hepatol* 2005; 43:606-13.

Germani G, Theocharidou E, Adam R, Karam V, Wendon J, O'Grady J, Burra P, Senzolo M, Mirza D, Castaing D, Klempnauer J, Pollard S, Paul A, Belghiti J,

Tsochatzis E, Burroughs AK. Liver transplantation for acute liver failure in Europe: Outcomes over 20years from the ELTR database. *J Hepatol* 2012; doi: 10.1016/j.jhep.2012.03.017

Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los M. Apoptosis in liver diseases--detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit* 2005; 11:RA337-45.

Gherardi E, Stoker M. Hepatocytes and scatter factor. *Nature* 1990; 346:228.

Giusti P, Gusella M, Lipartiti M, Milani D, Zhu W, Vicini S, Manev H. Melatonin protects primary cultures of cerebellar granule neurons from kainate but not from N-methyl-D-aspartate excitotoxicity. *Exp Neurol* 1995; 131:39-46.

Gong Q, Zhang H, Li JH, Duan LH, Zhong S, Kong XL, Zheng F, Tan Z, Xiong P, Chen G, et al. High-mobility group box 1 exacerbates concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *J Mol Med (Berl)* 2010; 88:1289-98.

González-Rodríguez A, Alba J, Zimmerman V, Kozma SC, Valverde AM. S6K1 deficiency protects against apoptosis in hepatocytes. *Hepatology* 2009; 50:216-29.

Gould AR, Kattenbelt JA, Lenghaus C, Morrissy C, Chamberlain T, Collins BJ, Westbury HA. The complete nucleotide sequence of rabbit haemorrhagic disease virus (czech strain V351): Use of the polymerase chain reaction to detect replication in australian vertebrates and analysis of viral population sequence variation. *Virus Res* 1997; 47:7-17.

Grabhorn E, Richter A, Burdelski M, Rogiers X, Ganschow R. Neonatal hemochromatosis: Long-term experience with favorable outcome. *Pediatrics* 2006; 118:2060-5.

Grace MS, Cahill GM, Besharse JC. Melatonin deacetylation: Retinal vertebrate class distribution and xenopus laevis tissue distribution. *Brain Res* 1991; 559:56-63.

Granzow H, Weiland F, Strebelow HG, Liu CM, Schirrmeier H. Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV): Ultrastructure and biochemical studies of typical and core-like particles present in liver homogenates. *Virus Res* 1996; 41:163-72.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. Science 1998; 281:1309-12.

Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neill JD, Studdert MJ, et al. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis* 2000; 181:S322-30.

Greenbaum LE, Li W, Cressman DE, Peng Y, Ciliberto G, Poli V, Taub R. CCAAT enhancer- binding protein beta is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *J Clin Invest* 1998 Sep 1;102(5):996-1007.

Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem* 2002; 2:167-79.

Gutteridge JM, Halliwell B. Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin Haematol* 1989; 2:195-256.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249:7130-9.

Halliwell B. The antioxidant paradox. Lancet 2000; 355:1179-80.

Hammond CL, Lee TK, Ballatori N. Novel roles for glutathione in gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes. *J Hepatol* 2001; 34:946-54.

Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more: Occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:2001-18.

Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: Multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 2005; 27:119-30.

Hardeland R, Balzer I, Poeggeler B, Fuhrberg B, Uria H, Behrmann G, Wolf R, Meyer TJ, Reiter RJ. On the primary functions of melatonin in evolution: Mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals. *J Pineal Res* 1995; 18:104-11.

Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17:347-57.

Harrison PM, Keays R, Bray GP, Alexander GJ, Williams R. Improved outcome of paracetamol-induced fulminant hepatic failure by late administration of acetylcysteine. *Lancet* 1990; 335:1572-3.

Harrison PM, Wendon JA, Gimson AE, Alexander GJ, Williams R. Improvement by acetylcysteine of hemodynamics and oxygen transport in fulminant hepatic failure. *N Engl J Med* 1991; 324:1852-7.

Hashimoto K, Minagawa H, Yanagi Y. Caspase-dependent apoptosis in fulminant hepatic failure induced by herpes simplex virus in mice. *J Hepatol* 2003; 39:773-8.

He Y, Zhou J, Dou KF, Chen Y. A rat model for acute hepatic failure. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2:423-5.

Hessel FP, Bramlage P, Wasem J, Mitzner SR. Cost-effectiveness of the artificial liver support system MARS in patients with acute-on-chronic liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010; 22:213-20.

Heubner O. Tumor der glandula pinealis. Detsch Med Wochenschr 1898; 24: 214-220

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976; 74:214-26.

Hong RT, Xu JM, Mei Q. Melatonin ameliorates experimental hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *World J Gastroenterol* 2009; 15:1452-8.

Hourcade D, Liszewski MK, Krych-Goldberg M, Atkinson JP. Functional domains, structural variations and pathogen interactions of MCP, DAF and CR1. *Immunopharmacology* 2000; 49:103-16.

Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of bax and bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:3668-72.

Hu S, Yin S, Jiang X, Huang D, Shen G. Melatonin protects against alcoholic liver injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis. *Eur J Pharmacol* 2009; 616:287-92.

Huang CS, Moore WR, Meister A. On the active site thiol of gamma-glutamylcysteine synthetase: Relationships to catalysis, inhibition, and regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:2464-8.

Huerto-Delgadillo L, Anton-Tay F, Benitez-King G. Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: Role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J Pineal Res* 1994; 17:55-62.

Huether G, Poeggeler B, Reimer A, George A. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: Evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci* 1992; 51:945-53.

Huh CG, Factor VM, Sanchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:4477-82.

Ichai P, Samuel D. Epidemiology of liver failure. Clin Res *Hepatol Gastroenterol*. 2011; 35:610-7.

Ishikawa K, Mochida S, Mashiba S, Inao M, Matsui A, Ikeda H, Ohno A, Shibuya M, Fujiwara K. Expressions of vascular endothelial growth factor in nonparenchymal as well as parenchymal cells in rat liver after necrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254:587-93.

Itoh MT, Ishizuka B, Kudo Y, Fusama S, Amemiya A, Sumi Y. Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase activities in rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 136:7-13.

Jacob RA, Burri BJ. Oxidative damage and defense. *Am J Clin Nutr* 1996; 63:985S-90S.

Jalan R. Acute liver failure: Current management and future prospects. *J Hepatol* 2005; 42:S115-23.

Jalan R, Hayes PC. Hepatic encephalopathy and ascites. *Lancet* 1997; 350:1309-15.

Ji LL. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med Sci Sports Exerc* 1993; 25:225-31.

Jin X, von Gall C, Pieschl RL, Gribkoff VK, Stehle JH, Reppert SM, Weaver DR. Targeted disruption of the mouse mel(1b) melatonin receptor. *Mol Cell Biol* 2003; 23:1054-60.

Jinnin M, Ihn H, Mimura Y, Asano Y, Yamane K, Tamaki K. Matrix metalloproteinase-1 up-regulation by hepatocyte growth factor in human dermal fibroblasts via ERK signaling pathway involves Ets1 and Fli1. *Nucleic Acids Res* 2005; 33:3540-9.

Jung JY, Lee BJ, Tai JH, Park JH, Lee YS. Apoptosis in rabbit haemorrhagic disease. *J Comp Pathol* 2000; 123:135-40.

Jung KH, Hong SW, Zheng HM, Lee DH, Hong SS. Melatonin downregulates nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappaB during prevention of oxidative liver injury in a dimethylnitrosamine model. *J Pineal Res* 2009; 47:173-83.

Kaikkonen MU, Maatta AI, Yla-Herttuala S, Airenne KJ. Screening of complement inhibitors: Shielded baculoviruses increase the safety and efficacy of gene delivery. *Mol Ther* 2010; 18:987-92.

Kaita KD, Assy N, Gauthier T, Zhang M, Meyers AF, Minuk GY. The beneficial effects of ciprofloxacin on survival and hepatic regenerative activity in a rat model of fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1998; 27:533-6.

Kang JW, Koh EJ, Lee SM. Melatonin protects liver against ischemia and reperfusion injury through inhibition of toll-like receptor signaling pathway. *J Pineal Res* 2011; 50:403-11.

Karakayali H, Ekici Y, Ozcay F, Bilezikci B, Arslan G, Haberal M. Pediatric liver transplantation for acute liver failure. *Transplant Proc* 2007; 39:1157-60.

Karbownik M, Reiter RJ, García JJ, Tan D. Melatonin reduces phenylhydrazineinduced oxidative damage to cellular membranes: Evidence for the involvement of iron. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32:1045-54.

Kato T, Ito Y, Hosono K, Suzuki T, Tamaki H, Minamino T, Kato S, Sakagami H, Shibuya M, Majima M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling promotes liver repair through restoration of liver microvasculature after acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 2011; 120:218-29.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-57.

Khan SA, Shah N, Williams R, Jalan R. Acute liver failure: A review. *Clin Liver Dis* 2006; 10:239,58, vii-viii.

Kim KM, Kim YM, Park M, Park K, Chang HK, Park TK, Chung HH, Kang CY. A broadspectrum caspase inhibitor blocks concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Clin Immunol* 2000; 97:221-33.

Kim SH, Lee SM. Cytoprotective effects of melatonin against necrosis and apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury in rat liver. *J Pineal Res* 2008; 44:165-71.

Kim TH, Mars WM, Stolz DB, Michalopoulos GK. Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration. *Hepatology* 2000; 31:75-82.

Kitazawa T, Tsujimoto T, Kawaratani H, Fukui H. Salvage effect of E5564, toll-like receptor 4 antagonist on d-galactosamine and lipopolysaccharide-induced acute liver failure in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25:1009-12.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275:1132-6.

Koh W, Jeong SJ, Lee HJ, Ryu HG, Lee EO, Ahn KS, Bae H, Kim SH. Melatonin promotes puromycin-induced apoptosis with activation of caspase-3 and 5'-adenosine monophosphate-activated kinase-alpha in human leukemia HL-60 cells. *J Pineal Res* 2011; 50:367-73.

Konakchieva R, Kyurkchiev S, Kehayov I, Taushanova P, Kanchev L. Selective effect of methoxyindoles on the lymphocyte proliferation and melatonin binding to activated human lymphoid cells. *J Neuroimmunol* 1995; 63:125-32.

Kopin IJ, Pare CM, Axelrod J, Weissbach H. The fate of melatonin in animals. *J Biol Chem* 1961; 236:3072-5.

Korkmaz A, Reiter RJ, Topal T, Manchester LC, Oter S, Tan DX. Melatonin: An established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol Med* 2009; 15:43-50.

Kosenko E, Kaminsky Y, Kaminsky A, Valencia M, Lee L, Hermenegildo C, Felipo V. Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. *Free Radic Res* 1997; 27:637-44.

Kosenko E, Venediktova N, Kaminsky Y, Montoliu C, Felipo V. Sources of oxygen radicals in brain in acute ammonia intoxication in vivo. *Brain Res* 2003; 981:193-200.

Koster-van Hoffen GC, Mirmiran M, Bos NP, Witting W, Delagrange P, Guardiola-Lemaitre B. Effects of a novel melatonin analog on circadian rhythms of body temperature and activity in young, middle-aged, and old rats. *Neurobiol Aging* 1993; 14:565-9.

Kotler M, Rodríguez C, Sainz RM, Antolín I, Menendez-Pelaez A. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J Pineal Res* 1998; 24:83-9.

Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, et al. Classification of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell Death Differ* 2005; 12:1463-7.

Kurus M, Esrefoglu M, Sogutlu G, Atasever A. Melatonin prevents cyclosporineinduced hepatotoxicity in rats. *Med Princ Pract* 2009; 18:407-10.

Ladurner R, Hochleitner B, Schneeberger S, Barnas U, Krismer A, Kleinsasser A, Offner F, Konigsrainer I, Margreiter R, Konigsrainer A. Extended liver resection and hepatic ischemia in pigs: A new, potentially reversible model to induce acute liver failure and study artificial liver support systems. *Eur Surg Res* 2005; 37:365-9.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.

Langnas AN, Markin RS, Cattral MS, Naides SJ. Parvovirus B19 as a possible causative agent of fulminant liver failure and associated aplastic anemia. *Hepatology* 1995; 22:1661-5.

Lauterburg BH, Smith CV, Hughes H, Mitchell JR. Biliary excretion of glutathione and glutathione disulfide in the rat. regulation and response to oxidative stress. *J Clin Invest* 1984; 73:124-33.

Lavazza A, Scicluna MT, 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* 1996; 43:401-10.

Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. J Cell Sci 2005; 118:265-7.

Lee WM. Recent developments in acute liver failure. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2012; 26:3-16.

Lee WM. Management of acute liver failure. Semin Liver Dis 1996; 16:369-78.

Lee WM. Acute liver failure. N Engl J Med 1993; 329:1862-72.

Leifeld L, Fink K, Debska G, Fielenbach M, Schmitz V, Sauerbruch T, Spengler U. Antiapoptotic function of gelsolin in fas antibody-induced liver failure in vivo. *Am J Pathol* 2006; 168:778-85.

Lerner LJ, Holthaus FJ, Thompson CR. A non-steroidal estrogen antiagonist 1-(p-2diethylaminoethoxyphenyl)-1-phenyl-2-p-methoxyphenyl ethanol. *Endocrinology* 1958; 63:295-318.

Lewy AJ, Wehr TA, Goodwin FK, Newsome DA, Markey SP. Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science* 1980; 210:1267-9.

Li W, Kong AN. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Carcinog* 2009; 48:91-104.

Li W, Liang X, Kellendonk C, Poli V, Taub R. STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration. *J Biol Chem* 2002; 277:28411-7.

Liang R, Nickkholgh A, Hoffmann K, Kern M, Schneider H, Sobirey M, Zorn M, Buchler MW, Schemmer P. Melatonin protects from hepatic reperfusion injury through inhibition of IKK and JNK pathways and modification of cell proliferation. *J Pineal Res* 2009; 46:8-14.

Liang TJ, Jeffers LJ, Reddy KR, De Medina M, Parker IT, Cheinquer H, Idrovo V, Rabassa A, Schiff ER. Viral pathogenesis of hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 1993; 18:1326-33.

Lieber CS, Casini A, DeCarli LM, Kim CI, Lowe N, Sasaki R, Leo MA. S-adenosyl-Lmethionine attenuates alcohol-induced liver injury in the baboon. *Hepatology* 1990; 11:165-72.

Lindenboim L, Yuan J, Stein R. Bcl-xS and bax induce different apoptotic pathways in PC12 cells. *Oncogene* 2000; 19:1783-93.

Liu J, Zhou ZX, Zhang W, Bell MW, Waalkes MP. Changes in hepatic gene expression in response to hepatoprotective levels of zinc. *Liver Int* 2009; 29:1222-9.

Liu SJ, Xue HP, Pu BQ y Quia NH. A new viral disease in rabbits. *Anim Husb Vet Med* 1984; 6: 253-255.

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104:487-501.

Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 2009; 30:42-59.

Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: Current concepts and controversies. *FASEB J* 1999; 13:1169-83.

Luchetti F, Betti M, Canonico B, Arcangeletti M, Ferri P, Galli F, Papa S. ERK MAPK activation mediates the antiapoptotic signaling of melatonin in UVB-stressed U937 cells. *Free Radic Biol Med* 2009; 46:339-51.

Ma X, Idle JR, Krausz KW, González FJ. Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug Metab Dispos* 2005; 33:489-94.

Macias M, Escames G, Leon J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A, Acuna-Castroviejo D. Calreticulin-melatonin. an unexpected relationship. *Eur J Biochem* 2003; 270:832-40.

Macias M, Rodríguez-Cabezas MN, Reiter RJ, Osuna A, Acuna-Castroviejo D. Presence and effects of melatonin in trypanosoma cruzi. *J Pineal Res* 1999; 27:86-94.

Maestroni GJ, Covacci V, Conti A. Hematopoietic rescue via T-cell-dependent, endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced by the pineal neurohormone melatonin in tumor-bearing mice. *Cancer Res* 1994; 54:2429-32.

Maity P, Bindu S, Dey S, Goyal M, Alam A, Pal C, Reiter R, Bandyopadhyay U. Melatonin reduces indomethacin-induced gastric mucosal cell apoptosis by preventing mitochondrial oxidative stress and the activation of mitochondrial pathway of apoptosis. *J Pineal Res* 2009; 46:314-23.

Makino H, Togo S, Kubota T, Morioka D, Morita T, Kobayashi T, Tanaka K, Shimizu T, Matsuo K, Nagashima Y, et al. A good model of hepatic failure after excessive hepatectomy in mice. *J Surg Res* 2005; 127:171-6.

Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: A tale of two deaths? *Hepatology* 2006; 43:S31-44.

Mallo C, Zaidan R, Galy G, Vermeulen E, Brun J, Chazot G, Claustrat B. Pharmacokinetics of melatonin in man after intravenous infusion and bolus injection. *Eur J Clin Pharmacol* 1990; 38:297-301.

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

Manchester LC, Poeggeler B, Alvares FL, Ogden GB, Reiter RJ. Melatonin immunoreactivity in the photosynthetic prokaryote rhodospirillum rubrum: Implications for an ancient antioxidant system. *Cell Mol Biol Res* 1995; 41:391-5.

Marcato PS, Benazzi C, Vecchi G, Galeotti M, Della Salda L, Sarli G, Lucidi P. Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the european brown hare syndrome. *Rev Sci Tech* 1991; 10:371-92.

Marques JM, Belza I, Holtmann B, Pennica D, Prieto J, Bustos M. Cardiotrophin-1 is an essential factor in the natural defense of the liver against apoptosis. *Hepatology* 2007; 45:639-48.

Marques PE, Amaral SS, Menezes GB. Cell death products and neutrophil-mediated liver damage: Beyond acetaminophen-induced injury. *Hepatology* 2012 doi: 10.1002/hep.25884.

Marra F, Aleffi S, Bertolani C, Petrai I, Vizzutti F. Adipokines and liver fibrosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005; 9:279-84.

Martín M, Macias M, Escames G, Leon J, Acuna-Castroviejo D. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J* 2000; 14:1677-9.

Martín M, Macias M, Leon J, Escames G, Khaldy H, Acuna-Castroviejo D. Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34:348-57.

Mas A, Escorsell A, Fernandez J. Liver transplantation for acute liver failure: A spanish perspective. *Transplant Proc* 2010; 42:619-21.

Mas A, Rodes J. Fulminant hepatic failure. *Lancet* 1997; 349:1081-5.

Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005; 16:577-86.

Master S, Gottstein J, Blei AT. Cerebral blood flow and the development of ammoniainduced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology* 1999; 30:876-80.

Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32:595-603.

Matsumaru K, Ji C, Kaplowitz N. Mechanisms for sensitization to TNF-induced apoptosis by acute glutathione depletion in murine hepatocytes. *Hepatology* 2003; 37:1425-34.

Mauriz JL, Molpeceres V, García-Mediavilla MV, González P, Barrio JP, González-Gallego J. Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats. *J Pineal Res* 2007; 42:222-30.

Mauriz JL, Tuñón MJ, González-Gallego J. Apoptotic signaling pathways as a target for the treatment of liver diseases. *Mini Rev Med Chem* 2008; 8:1485-93.

Mayo JC, Sainz RM, Antoli I, Herrera F, Martín V, Rodríguez C. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59:1706-13.

Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodríguez C, Reiter RJ. Antiinflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol* 2005; 165:139-49.

Mayoral R, Fernandez-Martínez A, Roy R, Bosca L, Martín-Sanz P. Dispensability and dynamics of caveolin-1 during liver regeneration and in isolated hepatic cells. *Hepatology* 2007; 46:813-22.

McCarthy M, Wilkinson ML. Recent advances: Hepatology. BMJ 1999; 318:1256-9.

McConkey DJ, Hartzell P, Nicotera P, Orrenius S. Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. *FASEB J* 1989; 3:1843-9.

McPhail MJ, Bajaj JS, Thomas HC, Taylor-Robinson SD. Pathogenesis and diagnosis of hepatic encephalopathy. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 4:365-78.

McPhail MJ, Wendon JA, Bernal W. Meta-analysis of performance of kings's college hospital criteria in prediction of outcome in non-paracetamol-induced acute liver failure. *J Hepatol* 2010; 53:492-9.

Meister A, Anderson ME. Glutathione. Annu Rev Biochem 1983; 52:711-60.

Menendez-Pelaez A, Poeggeler B, Reiter RJ, Barlow-Walden L, Pablos MI, Tan DX. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: Immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J Cell Biochem* 1993; 53:373-82.

Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ. Rabbit hemorrhagic disease virus--molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology* 1991; 184:664-76.

Mhatre MC, van Jaarsveld AS, Reiter RJ. Melatonin in the lacrimal gland: First demonstration and experimental manipulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 153:1186-92.

Michalopoulos G, Houck KA, Dolan ML, Leutteke NC. Control of hepatocyte replication by two serum factors. *Cancer Res* 1984; 44:4414-9.

Michalopoulos GK. Liver regeneration. J Cell Physiol 2007; 213:286-300.

Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. Science 1997; 276:60-6.

Mikami O, Park JH, Kimura T, Ochiai K, Itakura C. Hepatic lesions in young rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus. *Res Vet Sci* 1999; 66:237-42.

Minguet S, Cortegano I, Gonzalo P, Martínez-Marin JA, de Andres B, Salas C, Melero D, Gaspar ML, Marcos MA. A population of c-kit(low)(CD45/TER119)- hepatic cell progenitors of 11-day postcoitus mouse embryo liver reconstitutes cell-depleted liver organoids. *J Clin Invest* 2003; 112:1152-63.

Misra HP, Fridovich I. The purification and properties of superoxide dismutase from neurospora crassa. *J Biol Chem* 1972; 247:3410-4.

Mizuno S, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: A regenerative drug for acute hepatitis and liver cirrhosis. *Regen Med* 2007; 2:161-70.

Mochida S, Ishikawa K, Inao M, Shibuya M, Fujiwara K. Increased expressions of vascular endothelial growth factor and its receptors, flt-1 and KDR/flk-1, in regenerating rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226:176-9.

Molpeceres V, Mauriz JL, García-Mediavilla MV, González P, Barrio JP, González-Gallego J. Melatonin is able to reduce the apoptotic liver changes induced by aging via

inhibition of the intrinsic pathway of apoptosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007; 62:687-95.

Moore RY. A clock for the ages. Science 1999; 284:2102-3.

Morita T, Togo S, Kubota T, Kamimukai N, Nishizuka I, Kobayashi T, Ichikawa Y, Ishikawa T, Takahashi S, Matsuo K, et al. Mechanism of postoperative liver failure after excessive hepatectomy investigated using a cDNA microarray. *J Hepatobiliary Pancreat* Surg 2002; 9:352-9.

Moumen A, Ieraci A, Patane S, Sole C, Comella JX, Dono R, Maina F. Met signals hepatocyte survival by preventing fas-triggered FLIP degradation in a PI3k-akt-dependent manner. *Hepatology* 2007; 45:1210-7.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-50.

Murawska-Cialowicz E, Jethon Z, Magdalan J, Januszewska L, Podhorska-Okolow M, Zawadzki M, Sozanski T, Dziegiel P. Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in the liver, kidneys and brain of rats administered with benzo(a)pyrene. *Exp Toxicol Pathol* 2011;63:97-103.

Muto Y, Nouri-Aria KT, Meager A, Alexander GJ, Eddleston AL, Williams R. Enhanced tumour necrosis factor and interleukin-1 in fulminant hepatic failure. *Lancet* 1988; 2:72-4.

Myronovych A, Murata S, Chiba M, Matsuo R, Ikeda O, Watanabe M, Hisakura K, Nakano Y, Kohno K, Kawasaki T, et al. Role of platelets on liver regeneration after 90% hepatectomy in mice. *J Hepatol* 2008; 49:363-72.

Nakazawa K, Ijima H, Fukuda J, Sakiyama R, Yamashita Y, Shimada M, Shirabe K, Tsujita E, Sugimachi K, Funatsu K. Development of a hybrid artificial liver using polyurethane foam/hepatocyte spheroid culture in a preclinical pig experiment. *Int J Artif Organs* 2002; 25:51-60.

Natarajan A, Wagner B, Sibilia M. The EGF receptor is required for efficient liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:17081-6.

Navasa M, García-Pagan JC, Bosch J, Riera JR, Banares R, Mas A, Bruguera M, Rodes J. Portal hypertension in acute liver failure. *Gut* 1992; 33:965-8.

Navascues CA, Rodríguez M, Sotorrio NG, Leiva P, Martínez A, Perez R, de la Vega J, Rodrigo L. Epidemiological, clinical and biological characteristics of acute non-A, non-B hepatitis with and without hepatitis C virus infection. *Infection* 1994; 22:252-7.

Nevens F, Laleman W. Artificial liver support devices as treatment option for liver failure. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2012; 26:17-26.

Newsome PN, Plevris JN, Nelson LJ, Hayes PC. Animal models of fulminant hepatic failure: A critical evaluation. *Liver Transpl* 2000; 6:21-31.

Ng FW, Nguyen M, Kwan T, Branton PE, Nicholson DW, Cromlish JA, Shore GC. p28 Bap31, a bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 1997; 139:327-38.

Nguyen NT, Vierling JM. Acute liver failure. *Curr Opin Organ Transplant* 2011; 16:289-96.

Norenberg MD, Jayakumar AR, Rama Rao KV, Panickar KS. New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab Brain Dis* 2007; 22:219-34.

Nourjah P, Ahmad SR, Karwoski C, Willy M. Estimates of acetaminophen (paracetomal)-associated overdoses in the united states. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2006; 15:398-405.

Ogeturk M, Kus I, Pekmez H, Yekeler H, Sahin S, Sarsilmaz M. Inhibition of carbon tetrachloride-mediated apoptosis and oxidative stress by melatonin in experimental liver fibrosis. *Toxicol Ind Health* 2008; 24:201-8.

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

O'Grady JG. Acute liver failure. Postgrad Med J 2005; 81:148-54.

O'Grady JG, Alexander GJ, Hayllar KM, Williams R. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 1989; 97:439-45.

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

Ohashi N, Hori T, Chen F, Jermanus S, Eckman CB, Nakao A, Uemoto S, Nguyen JH. Matrix metalloproteinase-9 contributes to parenchymal hemorrhage and necrosis in the remnant liver after extended hepatectomy in mice. *World J Gastroenterol* 2012; 18:2320-33.

Ohlinger VF, Haas B, Meyers G, Weiland F, Thiel HJ. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J Virol* 1990; 64:3331-6.

Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* 1994; 79:189-92.

O'Neill LA. TAMpering with toll-like receptor signaling. Cell 2007; 131:1039-41.

Ookhtens M, Kaplowitz N. Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. *Semin Liver Dis* 1998; 18:313-29.

Orlowski M, Meister A. The gamma-glutamyl cycle: A possible transport system for amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1970; 67:1248-55.

Overturf K, al-Dhalimy M, Ou CN, Finegold M, Grompe M. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol* 1997; 151:1273-80.

Pablos MI, Reiter RJ, Ortiz GG, Guerrero JM, Agapito MT, Chuang JI, Sewerynek E. Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem Int* 1998; 32:69-75.

Paik YH, Schwabe RF, Bataller R, Russo MP, Jobin C, Brenner DA. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2003; 37:1043-55.

Pan G, O'Rourke K, Dixit VM. Caspase-9, bcl-XL, and apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* 1998; 273:5841-5.

Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J* 2006; 273:2813-38.

Pang SF, Yip MK, Liu HW, Brown GM, Tsui HW. Diurnal rhythms of immunoreactive N-acetylserotonin and melatonin in the serum of male rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1980; 95:571-6.

Paolicchi A, Dominici S, Pieri L, Maellaro E, Pompella A. Glutathione catabolism as a signaling mechanism. *Biochem Pharmacol* 2002; 64:1027-35.

Papa S, Bubici C, Zazzeroni F, Franzoso G. Mechanisms of liver disease: Cross-talk between the NF-kappaB and JNK pathways. *Biol Chem* 2009; 390:965-76.

Papaevangelou G, Tassopoulos N, Roumeliotou-Karayannis A, Richardson C. Etiology of fulminant viral hepatitis in Greece. *Hepatology* 1984; 4:369-72.

Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Serena D, Ruggiero FM. Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:42-50.

Park EY, Rho HM. The transcriptional activation of the human copper/zinc superoxide dismutase gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through two different regulator sites, the antioxidant responsive element and xenobiotic responsive element. *Mol Cell Biochem* 2002; 240:47-55.

Parra F, Prieto M. Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J Virol* 1990; 64:4013-5.

Patel R, Maru G. Polymeric black tea polyphenols induce phase II enzymes via Nrf2 in mouse liver and lungs. *Free Radic Biol Med* 2008; 44:1897-911.

Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 1995; 21:1725-41.

Pavanato A, Tuñón MJ, Sanchez-Campos S, Marroni CA, Llesuy S, González-Gallego J, Marroni N. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachlorideinduced cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2003; 48:824-9.

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001; 22:153-83.

Pediaditakis P, Lopez-Talavera JC, Petersen B, Monga SP, Michalopoulos GK. The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat. *Hepatology* 2001; 34:688-93.

Pessayre D, Haouzi D, Fau D, Robin MA, Mansouri A, Berson A. Withdrawal of life support, altruistic suicide, fratricidal killing and euthanasia by lymphocytes: Different forms of drug-induced hepatic apoptosis. *J Hepatol* 1999; 31:760-70.

Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284:1168-70.

Phaneuf D, Moscioni AD, LeClair C, Raper SE, Wilson JM. Generation of a mouse expressing a conditional knockout of the hepatocyte growth factor gene: Demonstration of impaired liver regeneration. *DNA Cell Biol* 2004; 23:592-603.

Pierrefiche G, Laborit H. Oxygen free radicals, melatonin, and aging. *Exp Gerontol* 1995; 30:213-27.

Pierrefiche G, Topall G, Courboin G, Henriet I, Laborit H. Antioxidant activity of melatonin in mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993; 80:211-23.

Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21:397-416.

Pleschka S. RNA viruses and the mitogenic Raf/MEK/ERK signal transduction cascade. *Biol Chem* 2008; 389:1273-82.

Plevris JN, Schina M, Hayes PC. Review article: The management of acute liver failure. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12:405-18.

Poeggeler B, Hardeland R. Detection and quantification of melatonin in a dinoflagellate, gonyaulax polyedra: Solutions to the problem of methoxyindole destruction in non-vertebrate material. *J Pineal Res* 1994; 17:1-10.

Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J Cell Biochem* 1997; 65:430-42.

Prieto JM, Fernandez F, Álvarez V, Espi A, García Marin JF, Álvarez M, Martín JM, Parra F. Immunohistochemical localisation of rabbit haemorrhagic disease virus VP-60 antigen in early infection of young and adult rabbits. *Res Vet Sci* 2000; 68:181-7.

Pryor WA. Oxy-radicals and related species: Their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol* 1986; 48:657-67.

Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. The proapoptotic activity of the bcl-2 family member bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 1999; 3:287-96.

Qi M, Elion EA. MAP kinase pathways. J Cell Sci 2005; 118:3569-72.

Qi W, Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Siu AW, García JJ. Increased levels of oxidatively damaged DNA induced by chromium(III) and H2O2: Protection by melatonin and related molecules. *J Pineal Res* 2000; 29:54-61.

Rademacher S, Oppert M, Jorres A. Artificial extracorporeal liver support therapy in patients with severe liver failure. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 5:591-9.

Radogna F, Cristofanon S, Paternoster L, D'Alessio M, De Nicola M, Cerella C, Dicato M, Diederich M, Ghibelli L. Melatonin antagonizes the intrinsic pathway of apoptosis via mitochondrial targeting of bcl-2. *J Pineal Res* 2008; 44:316-25.

Rahman TM, Hodgson HJ. Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol* 2000; 81:145-57.

Rahman TM, Selden AC, Hodgson HJ. A novel model of acetaminophen-induced acute hepatic failure in rabbits. *J Surg Res* 2002; 106:264-72.

Ramalingaswami V, Purcell RH. Waterborne non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1988; 1:571-3.

Reed JC. Bcl-2 family proteins. Oncogene 1998; 17:3225-36.

Reiter RJ. Melatonin and human reproduction. Ann Med 1998; 30:103-8.

Reiter RJ. Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: Antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol* 1995; 16:383-415.

Reiter RJ. The melatonin rhythm: Both a clock and a calendar. *Experientia* 1993; 49:654-64.

Reiter RJ. Melatonin: The chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 79:C153-8.

Reiter RJ. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; 12:151-80.

Reiter RJ. Pineal gland interface between the photoperiodic environment and the endocrine system. *Trends Endocrinol Metab* 1991; 2:13-9.

Reiter RJ. Comparative physiology: Pineal gland. Annu Rev Physiol 1973; 35:305-28.

Reiter RJ, Tan DX. What constitutes a physiological concentration of melatonin? *J Pineal Res* 2003; 34:79-80.

Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: Biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* 2003; 50:1129-46.

Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci* 2000; 7:444-58.

Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler B, Menendez-Pelaez A, Chen LD, Saarela S. Melatonin as a free radical scavenger: Implications for aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 719:1-12.

Reuben A. Alcohol and the liver. Curr Opin Gastroenterol 2008; 24:328-38.

Rifai K, Ernst T, Kretschmer U, Bahr MJ, Schneider A, Hafer C, Haller H, Manns MP, Fliser D. Prometheus--a new extracorporeal system for the treatment of liver failure. *J Hepatol* 2003; 39:984-90.

Ring-Larsen H, Palazzo U. Renal failure in fulminant hepatic failure and terminal cirrhosis: A comparison between incidence, types, and prognosis. *Gut* 1981; 22:585-91.

Riordan SM, Williams R. Fulminant hepatic failure. *Clin Liver Dis* 2000; 4:25-45.

Rodríguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004; 36:1-9.

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

Rolando N, Wade J, Davalos M, Wendon J, Philpott-Howard J, Williams R. The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology* 2000; 32:734-9.

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, Gores GJ. Liver cell necrosis: Cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 1995; 108:252-75.

Rudolph KL, Trautwein C, Kubicka S, Rakemann T, Bahr MJ, Sedlaczek N, Schuppan D, Manns MP. Differential regulation of extracellular matrix synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology* 1999; 30:1159-66.

Rutherford A, Chung RT. Acute liver failure: Mechanisms of hepatocyte injury and regeneration. *Semin Liver Dis* 2008; 28:167-74.

Saifuddin M, Hedayati T, Atkinson JP, Holguin MH, Parker CJ, Spear GT. Human immunodeficiency virus type 1 incorporates both glycosyl phosphatidylinositolanchored CD55 and CD59 and integral membrane CD46 at levels that protect from complement-mediated destruction. *J Gen Virol* 1997; 78:1907-11.

Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:6230-4.

Saile B, Ramadori G. Inflammation, damage repair and liver fibrosis--role of cytokines and different cell types. *Z Gastroenterol* 2007; 45:77-86.

Saito C, Zwingmann C, Jaeschke H. Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. *Hepatology* 2010; 51:246-54.

Sakuda S, Tamura S, Yamada A, Miyagawa J, Yamamoto K, Kiso S, Ito N, Imanaka K, Wada A, Naka T, et al. Activation of signal transducer and activator transcription 3 and expression of suppressor of cytokine signal 1 during liver regeneration in rats. *J Hepatol* 2002; 36:378-84.

Sanchez A, Fabregat I. Growth factor- and cytokine-driven pathways governing liver stemness and differentiation. *World J Gastroenterol* 2010; 16(:5148-61.

Sanchez-Campos S, Álvarez M, Culebras JM, González-Gallego J, Tuñón MJ. Pathogenic molecular mechanisms in an animal model of fulminant hepatic failure: Rabbit hemorrhagic viral disease. *J Lab Clin Med* 2004; 144:215-22.

Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, Daugherty CC, Brinster RL, Degen JL. Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell* 1991; 66:245-56.

San-Miguel B, Álvarez M, Culebras JM, González-Gallego J, Tuñón MJ. N-acetylcysteine protects liver from apoptotic death in an animal model of fulminant hepatic failure. *Apoptosis* 2006; 11:1945-57.

Scher J, Wankiewicz E, Brown GM, Fujieda H. MT(1) melatonin receptor in the human retina: Expression and localization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:889-97.

Schuppan D, Krebs A, Bauer M, Hahn EG. Hepatitis C and liver fibrosis. *Cell Death Differ* 2003; 10:S59-67.

Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. FASEB J 1995; 9:726-35.

Sen S, Rose C, Ytrebo LM, Davies NA, Nedredal GI, Drevland SS, Kjonno M, Prinzen FW, Hodges SJ, Deutz NE, et al. Effect of albumin dialysis on intracranial pressure increase in pigs with acute liver failure: A randomized study. *Crit Care Med* 2006; 34:158-64.

Sergi C, Adam S, Kahl P, 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* 2000; 3:568-83.

Shaham S, Horvitz HR. Developing caenorhabditis elegans neurons may contain both cell-death protective and killer activities. *Genes Dev* 1996; 10:578-91.

Shawcross DL, Wendon JA. The neurological manifestations of acute liver failure. *Neurochem Int.* 2012; 60:662-71.

Shida CS, Castrucci AM, Lamy-Freund MT. High melatonin solubility in aqueous medium. *J Pineal Res* 1994;16:198-201.

Shimizu H, Miyazaki M, Wakabayashi Y, Mitsuhashi N, Kato A, Ito H, Nakagawa K, Yoshidome H, Kataoka M, Nakajima N. Vascular endothelial growth factor secreted by replicating hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell proliferation during regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* 2001 May;34(5):683-9.

Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:916-21.

Sies H, Bartoli GM, Burk RF, Waydhas C. Glutathione efflux from perfused rat liver after phenobarbital treatment, during drug oxidations, and in selenium deficiency. *Eur J Biochem* 1978; 89:113-8.

Sitaram BR, Lees GJ. Diurnal rhythm and turnover of tryptophan hydroxylase in the pineal gland of the rat. *J Neurochem* 1978; 31:1021-6.

Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222:1-15.

Slater TF, Cheeseman KH, Davies MJ, Proudfoot K, Xin W. Free radical mechanisms in relation to tissue injury. *Proc Nutr Soc* 1987; 46:1-12.

Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: Hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999; 144:281-92.

Snyder SH, Axelrod J, Fischer JE, Wurtman RJ. Neural and photic regulation of 5hydroxytryptophan decarboxylase in the rat pineal gland. *Nature* 1964; 203:981-2. Song Z, Zhou Z, Chen T, Hill D, Kang J, Barve S, McClain C. S-adenosylmethionine (SAMe) protects against acute alcohol induced hepatotoxicity in mice small star, filled. *J Nutr Biochem* 2003; 14:591-7.

Sourdeval M, Lemaire C, Deniaud A, Taysse L, Daulon S, Breton P, Brenner C, Boisvieux-Ulrich E, Marano F. Inhibition of caspase-dependent mitochondrial permeability transition protects airway epithelial cells against mustard-induced apoptosis. *Apoptosis* 2006;11:1545-59.

Sriram N, Kalayarasan S, Sudhandiran G. Epigallocatechin-3-gallate augments antioxidant activities and inhibits inflammation during bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis through Nrf2-Keap1 signaling. *Pulm Pharmacol Ther* 2009; 22:221-36.

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

Stange J, Mitzner SR, Risler T, Erley CM, Lauchart W, Goehl H, Klammt S, Peszynski P, Freytag J, Hickstein H, et al. Molecular adsorbent recycling system (MARS): Clinical results of a new membrane-based blood purification system for bioartificial liver support. *Artif Organs* 1999; 23:319-30.

Stefulj J, Hortner M, Ghosh M, Schauenstein K, Rinner I, Wolfler A, Semmler J, Liebmann PM. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res* 2001; 30:243-7.

Sternberger LA, Hardy PH,Jr, Cuculis JJ, Meyer HG. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: Preparation and properties of soluble antigenantibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 1970; 18:315-33.

Strauss G, Hansen BA, Kirkegaard P, Rasmussen A, Hjortrup A, Larsen FS. Liver function, cerebral blood flow autoregulation, and hepatic encephalopathy in fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1997; 25:837-9.

Sugimoto H, Okada K, Shoda J, Warabi E, Ishige K, Ueda T, Taguchi K, Yanagawa T, Nakahara A, Hyodo I, et al. Deletion of nuclear factor-E2-related factor-2 leads to rapid onset and progression of nutritional steatohepatitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 298:G283-94.

Sugino N, Telleria CM, Gibori G. Differential regulation of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase in the rat corpus luteum: Induction of manganese superoxide dismutase messenger ribonucleic acid by inflammatory cytokines. *Biol Reprod* 1998; 59:208-15.

Sun Z, Zhang S, Chan JY, Zhang DD. Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Mol Cell Biol* 2007; 27:6334-49.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397:441-6.

Swarnakar S, Paul S, Singh LP, Reiter RJ. Matrix metalloproteinases in health and disease: Regulation by melatonin. *J Pineal Res* 2011; 50:8-20.

Tahan V, Atug O, Akin H, Eren F, Tahan G, Tarcin O, Uzun H, Ozdogan O, Tarcin O, Imeryuz N, et al. Melatonin ameliorates methionine- and choline-deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats. *J Pineal Res* 2009; 46:401-7.

Takai S, Nagaki M, Imao M, Kimura K, Kozawa O, Moriwaki H. Intrinsic resistance to TNF-alpha-induced hepatocyte apoptosis in ICR mice correlates with expression of a short form of c-FLIP. *Lab Invest* 2007; 87:572-81.

Takayama H, Miyake Y, Nouso K, Ikeda F, Shiraha H, Takaki A, Kobashi H, Yamamoto K. Serum levels of platelet-derived growth factor-BB and vascular endothelial growth factor as prognostic factors for patients with fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26:116-21.

Talarmin H, Rescan C, Cariou S, Glaise D, Zanninelli G, Bilodeau M, Loyer P, Guguen-Guillouzo C, Baffet G. The mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signalregulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating hepatocytes. *Mol Cell Biol* 1999; 19:6003-11.

Tan D, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Hanes MA, Farley NJ. High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Sci* 1999; 65:2523-9.

Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Zhang M, Weintraub ST, Cabrera J, Sainz RM, Mayo JC. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: Its origin and significance. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1472:206-14.

Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, Barlow-Walden LR. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett* 1993; 70:65-71.

Taub R. Liver regeneration: From myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5:836-47.

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

Terblanche J, Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci* 1991; 36:770-4.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. Science 1998; 281:1312-6.
Trautwein C, Rakemann T, Malek NP, Plumpe J, Tiegs G, Manns MP. Concanavalin Ainduced liver injury triggers hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 1998; 101:1960-9.

Trey C, Davidson CS. The management of fulminant hepatic failure. *Prog Liver Dis* 1970; 3:282-98.

Tunez I, Munoz MC, Medina FJ, Salcedo M, Feijoo M, Montilla P. Comparison of melatonin, vitamin E and L-carnitine in the treatment of neuro- and hepatotoxicity induced by thioacetamide. *Cell Biochem Funct* 2007; 25:119-27.

Tuñón MJ, Álvarez M, Culebras JM, González-Gallego J. Animal models of fulminant hepatic failure. *Nutr Hosp* 2007; 22:199-209.

Tuñón MJ, San Miguel B, Crespo I, Riezu-Boj JI, Larrea E, Álvarez M, González I, Bustos M, González-Gallego J, Prieto J. Cardiotrophin-1 promotes a high survival rate in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin. *J Virol* 2011; 85:13124-32.

Tuñón MJ, Sanchez-Campos S, García-Ferreras J, Álvarez M, Jorquera F, González-Gallego J. Rabbit hemorrhagic viral disease: Characterization of a new animal model of fulminant liver failure. *J Lab Clin Med* 2003; 141:272-8.

Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1985; 237:408-14.

Tygstrup N, Ranek L. Assessment of prognosis in fulminant hepatic failure. *Semin Liver Dis* 1986; 6:129-37.

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

Ueda K, Park JH, Ochiai K, Itakura C. Disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbit haemorrhagic disease. *Jpn J Vet Res* 1992; 40:133-41.

Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, Honma K, Kondo T. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:838-47.

Valla D, Flejou JF, Lebrec D, Bernuau J, Rueff B, Salzmann JL, Benhamou JP. Portal hypertension and ascites in acute hepatitis: Clinical, hemodynamic and histological correlations. *Hepatology* 1989; 10:482-7.

Van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martín SJ, Vandenabeele P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: A russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* 2002; 9:1031-42.

Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422:901-4.

Vollrath L. Mammalian pinealocytes: Ultrastructural aspects and innervation. *Ciba found Symp* 1985; 117:9-22.

Waldhauser F, Ehrhart B, Forster E. Clinical aspects of the melatonin action: Impact of development, aging, and puberty, involvement of melatonin in psychiatric disease and importance of neuroimmunoendocrine interactions. *Experientia* 1993; 49:671-81.

Wang H, Park O, Lafdil F, Shen K, Horiguchi N, Yin S, Fu XY, Kunos G, Gao B. Interplay of hepatic and myeloid signal transducer and activator of transcription 3 in facilitating liver regeneration via tempering innate immunity. *Hepatology* 2010; 51:1354-62.

Wang H, Xu DX, Lv JW, Ning H, Wei W. Melatonin attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced apoptotic liver damage in D-galactosamine-sensitized mice. *Toxicology* 2007; 237:49-57.

Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001; 15:2922-33.

Webber EM, Bruix J, Pierce RH, Fausto N. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology* 1998; 28:1226-34.

Wilkinson SP, Arroyo V, Gazzard BG, Moodie H, Williams R. Relation of renal impairment and haemorrhagic diathesis to endotoxaemia in fulminant hepatic failure. *Lancet* 1974; 1:521-4.

Williams LM, Morgan PJ. Demonstration of melatonin-binding sites on the pars tuberalis of the rat. *J Endocrinol* 1988; 119:R1-3.

Williams R. Classification, etiology, and considerations of outcome in acute liver failure. *Semin Liver Dis* 1996; 16:343-8.

Willis S, Day CL, Hinds MG, Huang DC. The bcl-2-regulated apoptotic pathway. *J Cell Sci* 2003; 116:4053-6.

Withyachumnarnkul B, Limpanawattanakul M, Trakulrungsi W. Retention of radioactive substances in the hypothalamus, anterior pituitary, and reproductive organs of male rats after 3H-melatonin administration. *Life Sci* 1986; 38:1757-65.

Wlodzimirow KA, Eslami S, Abu-Hanna A, Nieuwoudt M, Chamuleau RA. Systematic review: Acute liver failure - one disease, more than 40 definitions. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 35:1245-56.

Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: Apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 1999; 274:20049-52.

Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997; 139:1281-92.

Wong RK, Wai CT. A bolt out of the blue: A case of unexpected acute liver failure. *Ann Acad Med Singapore* 2006; 35:504-7.

Wu KC, Liu J, Klaassen CD. Role of Nrf2 in preventing ethanol-induced oxidative stress and lipid accumulation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; doi: 10.1016/j.bbr.2011.03.031.

Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: Association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 1984; 142:67-77.

Xu W, Hellerbrand C, Kohler UA, Bugnon P, Kan YW, Werner S, Beyer TA. The Nrf2 transcription factor protects from toxin-induced liver injury and fibrosis. *Lab Invest* 2008; 88:1068-78.

Xu ZJ, Chen WX. Viral haemorrhagic disease in rabbits: A review. *Vet Res Commun* 1989; 13:205-12.

Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, 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* 1997; 94:1441-6.

Yan C, Zhou L, Han YP. Contribution of hepatic stellate cells and matrix metalloproteinase 9 in acute liver failure. *Liver Int* 2008; 28:959-71.

Yang H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, Wang H, Ochani M, Li J, Lu B, Chavan S, Rosas-Ballina M, Al-Abed Y, et al. A critical cysteine is required for HMGB-1 binding to toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc Natl Acad Sci U S* A 2010; 107:11942-7.

Ytrebo LM, Korvald C, Nedredal GI, Elvenes OP, Nielsen Grymyr OJ, Revhaug A. Nacetylcysteine increases cerebral perfusion pressure in pigs with fulminant hepatic failure. *Crit Care Med* 2001; 29:1989-95.

Yu MJ, McCowan JR, Thrasher KJ, Keith PT, Luttman CA, Ho PP, Towner RD, Bertsch B, Horng JS, Um SL. Phenothiazines as lipid peroxidation inhibitors and cytoprotective agents. *J Med Chem* 1992; 35:716-24.

Zhai Y, Shen XD, O'Connell R, Gao F, Lassman C, Busuttil RW, Cheng G, Kupiec-Weglinski JW. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J Immunol* 2004; 173:7115-9.