

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

REGULACIÓN DE LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL Y DE
LA BIOGÉNESIS RIBOSOMAL EN LA CIRROSIS BILIAR
EN RATAS

ALESSANDRO ARDUINI

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 25 de maig de 2009 davant un tribunal format per:

- Dr. José Viña Ribes
- Dr. Federico Vicente Pallardó Calatayud
- Dra. Marta Casado Pinna
- Dra. María Monsalve Pérez
- Dr. Giuseppe Poli

Va ser dirigida per:
Dr. Juan Sastre Belloch

©Copyright: Servei de Publicacions
Alessandro Arduini

Dipòsit legal: V-1033-2010

I.S.B.N.: 978-84-370-7566-2

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Arts Gràfiques, 13 baix
46010 València
Spain
Telèfon:(0034)963864115



**Regulación de la biogénesis
mitocondrial y de la biogénesis
ribosomal en la cirrosis biliar
secundaria en ratas.**

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

Alessandro Arduini

DIRIGIDA POR:

Prof. Dr. Juan José Sastre Belloch

Valencia, 2009



Departamento de Fisiología

El Prof. Dr. Juan José Sastre Belloch, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Universitat de València

CERTIFICA:

Que Alessandro Arduini, Licenciado en Ciencias de la Educación Física y el Deporte por la Università degli Studi de Milán, Italia, ha realizado bajo mi dirección la presente Tesis titulada

“Regulación de la biogénesis mitocondrial y de la biogénesis ribosomal en la cirrosis biliar secundaria en ratas.”

para la obtención del título de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente.

Valencia, a 12 de enero de 2009

Fdo. Prof. Dr. Juan José Sastre Belloch

La presente Tesis Doctoral se ha podido realizar gracias a la financiación obtenida de los siguientes proyectos:

- Ministerio de Educación y Ciencia (Consolider CSD-2007-0020)
- Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2006-06963)
- Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2003-05865)

Alla mia famiglia

AGRADECIMIENTOS

- A Juan Sastre, por haberme ofrecido la gran oportunidad de crecer en mi vida profesional, y haber sido un buen maestro. En especial te agradezco el haberme ayudado a afrontar las amarguras del trabajo de investigador, y por las numerosas veces que, sentado en tu despacho, me has reconfortado y animado a seguir.
- A Federico Pallardó y José Viña, por haberme acompañado en este largo camino, ofreciéndome muchos momentos de reflexión sobre mis estudios doctorales.
- A Gaetano Serviddio, per avermi aiutato a gettare le fondamenta nel mondo della ricerca, offrendomi amicizia e sostegno scientifico. Da Trilussa alla cirrosi biliare il passo é stato rapido e indolore!
- A Javi Escobar, amigo especial, compañero de trabajo, aliviador de penas, colega de discusiones científicas y cafés.
- A Javi Pereda, por haberme enseñado a sobrevivir en un laboratorio, y a Dolores Royo, por tu disponibilidad y sinceridad.
- A Mari Carmen Gómez Cabrera, por haber sido una excelente guía y un ejemplo a seguir, por haber contribuido a mi formación profesional, y haber valorado mi forma de ser. Gracias por tu amistad.
- A Nancy J. Mora, por haber sido mi inseparable compañera de trabajo durante mucho tiempo. Jelena Markovic, por tu coraje científico. Juan Gambini, por ofrecerme tu ayuda en muchos momentos, sobre todo por adentrarme en el oscuro mundo de la Bioquímica. Paco Dasi y Manolo Mata, por enseñarme mucho sobre la

Biología Molecular, por haber dado soluciones a mis necesidades, y por haberlo hecho de forma desinteresada. Quisiera agradecer también a amigos y compañeros de la Facultad de Medicina: Raul López, José Luis García, Chelo Borrás, Ana Lloret, Soraya Vallés, Ruben Edo, Inmaculada Ramírez, Juan Bautista Miñana, Amparo Gimeno, Fabian Sanchis, Vladimir Martínez, Ana Lucía Nascimento, Lele Domenech, Pepe Viña Jr., Alfonso Sabater, Ana Broseta, Carme Pérez, Consuelo Escrivá, y Carmiña Rams.

- A Juana Belloch, la “maestra” del aislamiento de hepatocitos.
- A Ángel Ortega y Salva Mena, por ofrecerme ayuda en todo momento que lo he necesitado. Quisiera agradecer también a mis amigos y colegas de Farmacia: Julian Carretero, María Benlloch, Fatima Feddi, María Rodríguez, Miguel Asensi, José Estrela, Vannina Gonzales, Javier Miranda, Teresa Jover, José Centeno, Carla Gímenez, Alba Usano, e Isabel Andújar.
- A Juan Viña, Elena García y Concepción García por sus consejos sobre técnicas de laboratorio.
- A Ana Flores, Inmaculada Noguera y Jesus Dehesa por su impecable trabajo y constante ayuda en mi labor investigadora.
- A Eva Gimenez, Mari Blanch, Elena Caverro, Elena Plano. y Marilyn Noyes por su grande capacidad de solucionar problemas administrativos y burocráticos.
- A Máximo Vento, por haberme mostrado el lado apasionante de la investigación médica. Gracias por contribuir a mi formación profesional.

- A Raquel Escrig, amiga y colega, por todos los experimentos que hemos hecho juntos.
- A María Monsalve, por su continuo apoyo y ayuda en mi crecimiento científico.
- To Primal de Lanerolle, for the great contribution to my knowledge in Cellular Biology and his teachings about “what doing science means”.
- To Sarah and Terry Finnegan, for yours exquisite, sincere and genuine help.
- A Marco Romagnoli, un grande amico, che mi ha aiutato ed ha reso possibile il mio sogno di fare ricerca, offrendomi solidarietà, sostegno e disponibilità.
- A Teresa Froio, che ha lasciato un'impronta importante nella nostra vita, che ha mostrato a tutti noi un grande spirito di sacrificio, responsabilità e correttezza. Il tuo sorriso mi accompagnerá nei momenti di dubbio e di smarrimento.
- Alla mia famiglia, per tutti gli inconvenienti che la mia passione per la ricerca ha creato, per il tempo che questo lavoro ci ha sottratto, per la lontananza che ha interposto fra di noi e per la difficoltà di poter stare insieme.
- A Carmen, para el apoyo continuo y la comprensión que has tenido hacia mi, para tu esfuerzo inigualable por mostrarme un lado distinto de la vida, por ayudarme a superar todo momento de abandono y debilidad. Gracias por el amor que me demuestras día tras día.
- Y a todos los amigos y familiares que no mencioné expresamente, que por cansancio y ganas de acabar la Tesis, me dejé sin mencionar. Gracias.

ÍNDICE CAPITULOS

1. INTRODUCCIÓN.....	23
1.1. Fisiopatología de la colestasis y de la cirrosis biliar	24
1.1.1. Generalidades.....	24
1.1.2. La colestasis.....	26
1.1.2.a. Técnicas y métodos para el diagnóstico.....	27
1.1.3. La fibrosis hepática.....	29
1.1.3.a. Técnicas y métodos para el diagnóstico.....	30
1.1.3.b. Patogénesis de la fibrosis hepática.....	32
1.1.4. La cirrosis biliar primaria	36
1.2. Modelo experimental de cirrosis biliar inducida por colestasis extrahepática crónica	38
1.2.1. La fibrosis en la colestasis extrahepática experimental	40
1.2.2. El trastorno metabólico en la colestasis extrahepática experimental	41
1.2.3. Respiración mitocondrial en la colestasis extrahepática experimental	42
1.2.4. El daño oxidativo y nitrosativo en la colestasis extrahepática experimental.....	44
1.3. La biogénesis mitocondrial.....	47
1.3.1. La biogenesis mitocondrial require la cooperación del genoma nuclear y mitocondrial.....	48
1.3.2. Regulación de la biogénesis mitocondrial a nivel nuclear: Nrf-1, Gabp- α y Pgc-1 α y sus rutas de activación	51
1.3.2.a. NRF-1.....	51
1.3.2.b. GABP- α /NRF-2 α	54
1.3.2.c. ERR- α	55

1.3.3.	Coactivadores en la regulación de la biogénesis mitocondrial.....	56
1.3.3.a.	PGC-1 α	57
1.3.3.b.	PGC-1 β	60
1.3.3.c.	PRC.....	61
1.3.4.	Regulación de la expresión y mantenimiento del ADN mitocondrial.....	63
1.3.5.	El sistema de import mitocondrial.....	66
1.3.5.a.	Transporte de pre-proteínas mitocondriales hacia la mitocondria: papel de las chaperonas citosólicas.....	68
1.3.5.b.	El complejo de import de la membrana mitocondrial externa (TOMM).....	69
1.3.5.c.	El complejo de import de la membrana mitocondrial interna (TIMM).....	72
1.3.5.d.	Papel del potencial de membrana, ATP y GTP en el import de proteínas.....	74
1.3.5.e.	Chaperonas mitocondriales.....	76
1.4.	La biogénesis ribosomal y la proliferación celular.....	76
1.4.1.	Transcripción de genes ribosomales en el nucleolo y síntesis de ribosomas.....	78
1.4.2.	Regulación de la biogenesis ribosomal durante el crecimiento celular: implicación de las modificaciones post-traduccionales.....	79
1.4.3.	Regulación de la transcripción de genes ribosomales en el hígado sano y en enfermedades hepáticas.....	83
1.4.4.	Regulación de la biogenesis ribosomal en la respuesta a estrés y en los procesos oncogénicos.....	84
2.	OBJETIVOS.....	88
2.1.	Hipótesis de trabajo.....	89

2.2. Objetivos	90
3. MATERIALES Y MÉTODOS	93
3.1. Materiales	94
3.1.1. Aparatos	94
3.1.2. Reactivos	95
3.2. Animales de experimentación y cirugía.....	97
3.2.1. Técnica quirúrgica: ligadura del ducto biliar	98
3.3. Técnicas de laboratorio.....	100
3.3.1. Determinación de bilirrubina total en plasma.....	100
3.3.1.a. Principio	101
3.3.1.b. Procedimiento.....	101
3.3.1.c. Patrón	101
3.3.1.d. Correcciones	102
3.3.2. Actividad de la γ -glutamyl transpeptidasa	102
3.3.2.a. Procedimiento.....	103
3.3.2.b. Cálculos.....	104
3.3.3. Determinación del glutatión reducido (GSH)	105
3.3.3.a. Principio	105
3.3.3.b. Método.....	105
3.3.4. Detección de fibrosis en cortes de tejido por inmunohistoquímica.....	106
3.3.4.a. Aclaramiento	107
3.3.4.b. Inclusión	107
3.3.4.c. Sección o corte	108
3.3.4.d. Montaje y tinción	108
3.3.5. Homogeneización del tejido	109
3.3.6. Aislamiento de mitocondrias.....	110
3.3.6.a. Procedimiento.....	110

3.3.7.	Extracción de proteínas nucleares.....	112
3.3.7.a.	Soluciones a preparar	112
3.3.8.	Determinación de la concentración de proteínas	114
3.3.9.	Determinación de proteínas específicas por <i>western blotting</i>	115
3.3.9.a.	Electroforesis de proteínas	115
3.3.9.b.	Transferencia de proteínas a una membrana	116
3.3.9.c.	Reconocimiento de la proteína estudiada con anticuerpos específicos	116
3.3.9.d.	Captura de imagen por autorradiografía	118
3.3.9.e.	Determinación de los niveles totales de p53 y de su fosforilación.....	119
3.3.10.	Extracción de ácido ribonucleico (ARN)	120
3.3.11.	Electroforesis de ARN en gel de agarosa	121
3.3.11.a.	Soluciones utilizadas.....	122
3.3.11.b.	Procedimiento	123
3.3.12.	Electroforesis capilar	123
3.3.13.	Retrotranscripción (RT) del ARN a ADNc	124
3.3.14.	Extracción de ADN total	124
3.3.15.	Amplificación de secuencias específicas del ADN genómico y del ADNc, y determinación cuantitativa por PCR a tiempo real.....	127
3.3.15.a.	Procedimiento	129
3.3.16.	Diseño de oligonucleótidos (primers)	129
3.3.16.a.	Cálculos.....	131
3.4.	Análisis estadístico	134
4.	RESULTADOS.....	135
4.1.	Caracterización del modelo de cirrosis biliar	136
4.1.1.	Parámetros generales	136

4.1.2.	Bioquímica hemática	138
4.1.3.	Marcadores de fibrosis hepática.....	139
4.2.	La biogénesis mitocondrial en la cirrosis biliar	144
4.3.	Proliferación celular y biogénesis ribosomal en la cirrosis biliar ..	164
5.	DISCUSIÓN.....	175
5.1.	Desarrollo de fibrosis hepática en la cirrosis biliar secundaria	176
5.2.	Biogénesis mitocondrial en la cirrosis biliar secundaria.....	179
5.3.	Biogénesis ribosomal en la cirrosis biliar secundaria	186
6.	CONCLUSIONES.....	195
7.	DISCUSSION.....	199
7.1.	Mitochondrial biogenesis in secondary biliary cirrhosis	200
7.2.	Liver proliferation and ribosome biogenesis in biliary cirrhosis ..	208
8.	CONCLUSIONS.....	217
9.	BIBLIOGRAFÍA	221

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura hepática.....	25
Figura 2. Características fenotípicas de la activación de las células hepáticas estrelladas.....	33
Figura 3. Biogénesis mitocondrial integración de señales entre el genoma nuclear y mitocondrial.....	50
Figura 4. Biogénesis mitocondrial dependiente de prc.....	62
Figura 5. Sistema de import mitocondrial.....	67
Figura. 6. Erk promueve la biogénesis ribosomal a múltiples niveles.....	81
Figura. 7. Erk es responsable de la activación de myc.....	86
Figura. 8. Regulación de la maquinaria del ciclo celular por rb.....	87
Figura. 9. Técnica quirúrgica ligadura del ducto biliar común.....	99
Figura. 10. Características morfológicas de la colestasis extrahepática.....	136
Figura. 11. Variación del peso de las ratas durante la fase experimental.....	137
Figura. 12. Inmunohistoquímica hepática para el análisis de la fibrosis.....	139
Figura. 13. Expresión del gen de la enzima convertora de la angiotensina 1 en hígado.....	140
Figura. 14. Actina total en hígado de rata.....	141
Figura. 15. Expresión de genes pro-fibrogénicos en hígado.....	142
Figura. 16. Activación de nf-kb en hígado colestásico.....	143
Figura. 17. Densidad mitocondrial y cociente adnmt/adnn en hígado de rata.....	145
Figura. 18. Abundancia proteica de pdk en hígado de rata.....	146

Figura. 19. Abundancia proteica de sirt-1 en hígado de rata.	147
Figura. 20. Expresión de genes reguladores de la biogénesis mitocondrial.....	148
Figura. 21. Nivel de proteína de pgc-1 α en hígado de rata.	149
Figura. 22. Abundancia proteica de gabp- α en hígado de rata.....	150
Figura. 23. Estudio de la fosforilación de nrf-1 en hígado.....	151
Figura. 24. Abundancia proteica de la forma fosforilada de akt(ser473) en hígado de rata.....	153
Figura. 25. Estudio de la fosforilación de ampk en hígado de rata.	154
Figura. 26. Nivel de proteína de la ciclina d1 y la cdk-4.....	154
Figura. 27. Expresión de genes diana de nrf-1, gabp- α y pgc-1 α , implicados en la biogénesis mitocondrial.....	155
Figura. 28. Expresión de genes implicados en la biogénesis mitocondrial, codificados a nivel nuclear.....	156
Figura. 29. Expresión de tfam en hígado de rata.....	157
Figura. 30. Expresión de genes de receptores de membrana, implicados en el <i>import</i> mitocondrial.....	158
Figura. 31. Estudio de la abundancia de proteínas del sistema de <i>import</i> de la membrana mitocondrial externa.....	159
Figura. 32. Estudio de las principales chaperonas citosólicas y mitocondriales.....	161
Figura. 33. Estudio de la expresión de vdac/porina1 en hígado y en mitocondrias hepáticas.....	162
Figura. 34. Curva de supervivencia en ratones <i>knockout</i> del gen ppargc-1 α con ligadura del ducto biliar.....	163
Figura. 35. Nivel de proteína de pcna en hígado.	164
Figura. 36. Determinación de la cantidad de dna en hígado.....	165

Figura 37. Estudio de la fosforilación de la map quinasas p38 y erk1/2.....	166
Figura. 38. Determinación de los niveles de proteínas nitradas en hígado.	167
Figura 39. Estudio de la fosforilación c-myc.....	168
Figura 40. Estudio de la abundancia proteica de mad-1.....	169
Figura 41. Estudio de ubf, gen diana de c-myc.....	170
Figura 42. Estudio de prb en hígado.	171
Figura. 43. Expresión de genes de proteínas ribosomales.....	171
Figura 44. Estudio cromatográfico de las distintas especies de arnr y de transferencia.....	172
Figura. 45. Expresión de genes de proteínas reguladoras, implicadas en la biogénesis ribosomal.....	173
Figura. 46. Expresión de proteínas implicadas en la apoptosis y el arresto del ciclo celular.	174

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Causas de la colestasis.....	29
Tabla 2. Anticuerpos utilizados para el estudio.....	117
Tabla 3. <i>Primers</i> utilizados para el estudio	133
Tabla 4. Características morfológicas.....	137
Tabla 5. Bioquímica hemática.....	138

ABREVIATURAS

Adenosina 5'-difosfato	ADP	<i>Adenosine 5'-diphosphate</i>
AMP quinasa	AMPK	<i>AMP kinase</i>
Adenosina 5'-trifosfato	ATP	<i>Adenosine 5'-triphosphate</i>
Nucleofosmina	B23/NPM-1	<i>Nucleophosmin</i>
Proteína de unión a CREB	CBP	<i>CREB-binding protein</i>
Quinasa dependiente de ciclina 1	CDK-1	<i>Cyclin-dependent kinase 1</i>
Quinasa dependiente de ciclina 4	CDK-4	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>
Homólogo del oncogén aviar de la mieloblastosis viral	c-MYB	<i>Myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)</i>
Oncogén de la mielocistomatosis	c-MYC	<i>Myelocytomatosis oncogene</i>
Óxido nítrico sintasa constitutiva (utilizado por algunos autores para describir la eNOS y la nNOS)	cNOS	<i>Nitric oxide synthase, constitutive form (used by some authors instead of eNOS and nNOS)</i>
Carnitin-palmitoiltransferasa I / II	CPT-I / II	<i>Carnitine palmitoyltransferase I / II</i>
Proteína de unión a elementos que responden al cAMP	CREB	<i>cAMP response-element-binding protein</i>
Factor eucariótico de iniciación de la traducción 6	EIF6/ p27BBP	<i>Eukaryotic translation initiation factor 6</i>
Óxido nítrico sintasa endotelial	eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
Quinasa regulada por estímulos extracelulares 1 / 2	ERK1/2	<i>Extracellular regulated kinase 1 / 2</i>
Proteína de unión a secuencias ricas en GA - alpha	GABP-α	<i>GA-binding factor-alpha</i>
Poros de import general	GIP	<i>general import pore</i>
Factor de crecimiento de los hepatocitos	HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
Células hepáticas estrelladas	HSC	<i>Hepatic stellate cells</i>
Promotor de hembra pesada	HSP	<i>Heavy strand promoter</i>
Proteína de respuesta a choque térmico (de) 60 (kDa)	HSP60	<i>Heat shock protein 60 (kDa)</i>
Proteína de respuesta a choque térmico (de) 70 (kDa)	HSP70	<i>Heat shock protein 70 (kDa)</i>
Óxido nítrico sintasa inducible	iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
Quinasa c-Jun amino-terminal-2	JNK-2	<i>c-Jun N-terminal kinase-2</i>
Promotor de hembra ligera	LSP	<i>Light strand promoter</i>
Proteína de deficiencia de arresto mitótico 1	MAD-1	<i>Mitotic arrest deficient 1</i>
Proteína quinasa activada por mitógenos	MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
Factor X asociado a MYC	MAX	<i>MYC-associated factor X</i>

Proteína de dominio ADN-J 1	MDJ-1	<i>DNAJ domain protein 1</i>
Factor potenciador del miocito-2	MEF-2	<i>Myocyte enhancing factor-2</i>
Quinasa-quinasa activada por mitógenos	MEK	<i>Mitogen activated protein kinase kinase</i>
Metaloproteínasa de matriz	MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
Factor estimulante el <i>import</i> mitocondrial	MSF	<i>mitochondrial import stimulation factor</i>
Proteína mitocondrial de respuesta a choque térmico (de) 70 (kDa)	mtHSP70	<i>Mitochondrial heat shock protein 70 (kDa)</i>
Diana de la rapamicina en mamíferos	mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
Poro de permeabilidad transitoria mitocondrial	MTP	<i>Mitochondrial transition pore</i>
Secuencia de reconocimieto mitocondrial	MTS	<i>Mitochondrial targeting sequence</i>
Factor nuclear de la respiración-1	NRF-1	<i>Nuclear respiratory factor-1</i>
Factor nuclear de la respiración-2	NRF-2	<i>Nuclear respiratory factor-2</i>
Fosforilación oxidativa	OXPHOS	<i>Oxidative phosphorylation</i>
Proteína supresor tumoral de 53 kDa	p53	<i>Tumor suppressor protein 53 kDa</i>
Antígeno nuclear de la proliferación celular	PCNA	<i>Proliferating cellular nuclear antigen</i>
factor de crecimiento derivado de las plaquetas	PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
Piruvato deshidrogenasa quinasa	PDK	<i>Pyruvate dehydrogenase kinase</i>
Coactivador 1 alpha del PPAR-gamma	PGC-1α	<i>PPAR-gamma coactivator-1 alpha</i>
Receptor activado de la proliferación de los peroxisomas	PPAR	<i>Peroxisome proliferator activated-receptor</i>
Proteína del retinoblastoma	pRB	<i>Retinoblastoma protein</i>
Factor activado por RAS	RAF	<i>RAS activated factor</i>
Oncogén viral del sarcoma de rata	RAS	<i>Rat viral sarcoma oncogene</i>
Especies reactivas de oxígeno	ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
Complejo proteico del factor de selectividad 1	SL-1	<i>Selectivity factor protein complex 1</i>
Pequeña ribonucleoproteína nucleolar	snoRNP	<i>Small nucleolar ribonucleoprotein</i>
Pequeña proteína modificante, relacionada con la ubiquitina	SUMO	<i>Small ubiquitin-related modifier</i>
Potencial de membrana mitocondrial	$\Delta\psi_m$	<i>Mitochondrial membrane potential</i>
Factor de activación de la transcripción	TAF	<i>Transcription activating factor</i>
Factor de transcripción A, mitocondrial	TFAM	<i>Transcription factor A, mitochondrial</i>
Factor de transcripción B1,	TFB1M	<i>Transcription factor B1,</i>

mitocondrial		<i>mitochondrial</i>
Factor de transcripción B2, mitocondrial	TFB2M	<i>Transcription factor B2, mitochondrial</i>
Factor transformador del crecimiento-beta 1	TGF-1β1	<i>Transforming growth factor-beta 1</i>
Factor de iniciación de la transcripción IA	TIF-IA	<i>Transcription initiation factor IA</i>
Complejo de translocación de la membrana mitocondrial interna	TIMM	<i>Translocase of the inner mitochondrial membrane</i>
Inhibidor tisular de las metaloproteinasas	TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
Factor de necrosis tumoral α	TNF-α	Tumor necrosis factor α
Complejo de translocación de la membrana mitocondrial externa	TOMM	<i>Translocase of the outer mitochondrial membrane</i>
Factor de unión <i>upstream</i>	UBF	<i>Upstream binding factor</i>
Proteína desacoplante 1	UCP-1	<i>Uncoupling protein 1</i>
Proteína desacoplante 2	UCP-2	<i>Uncoupling protein 2</i>
Ácido ursodesoxicólico	UDCA	<i>Ursodeoxycholic acid</i>
Proteína de cartílago-39	YKL-40	<i>Cartilage glycoprotein-39</i>
Alpha actina del músculo liso	α-SMA	<i>Alpha-smooth muscle actin</i>

INTRODUCCIÓN

Capítulo Primero

1.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA COLESTASIS Y DE LA CIRROSIS BILIAR

1.1.1. GENERALIDADES

El hígado es el órgano más voluminoso del cuerpo humano, y uno de las más importantes con respecto a la actividad metabólica del organismo. Desempeña funciones únicas y vitales como la síntesis de proteínas plasmáticas, urea, almacén de vitaminas, entre otras. Tiene también una función de detoxificación, ya que es el responsable de eliminar las sustancias que pueden resultar nocivas para el organismo, transformándolas generalmente en otras inocuas.

La circulación hepática es de naturaleza centrípeta y está formada por el sistema porta y la arteria hepática. El sistema porta transporta sangre poco oxigenada y rica en nutrientes, proveniente del tracto gastrointestinal, del páncreas y del bazo. Este sistema constituye el 70-75 % del flujo sanguíneo hepático (~750 mL/min), siendo el restante 25 % proporcionado por la arteria hepática (~250 mL/min) [Doi R. *et al.*, 1988]. La circulación general depende de la arteria hepática, rama del tronco celíaco que contiene la sangre oxigenada (irrigación nutricia) (**Figura 1**).

Cada espacio porta se encuentra en la confluencia de los lobulillos hepáticos, que son formaciones más o menos hexagonales de células hepáticas y que posee en el centro la vena centrolobulillar, cuya confluencia da lugar a las venas hepáticas, que finalmente drenan en la vena cava inferior. Por lo tanto, la sangre rica en nutrientes provenientes de la absorción intestinal (vena porta) y la rica en oxígeno (arteria hepática), se mezclan en los sinusoides hepáticos (espacios entre hepatocitos). Algunos fenómenos infecciosos, tóxicos e inflamatorios, entre otros, desestructuran los lobulillos hepáticos y los espacios porta conduciendo a la hipertensión portal, ya que obstaculizan el flujo sanguíneo.

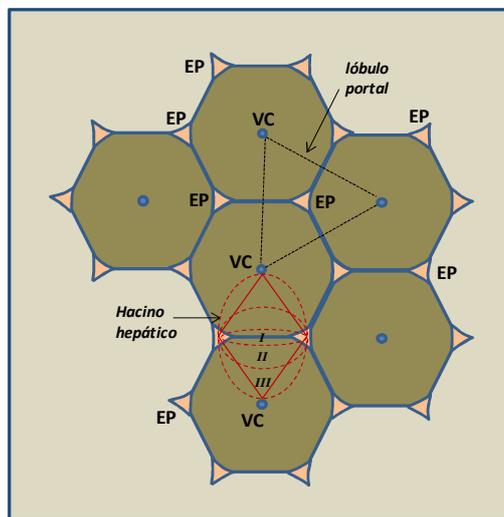


Figura 1. Estructura hepática. El lóbulo hepático está determinado anatómicamente por el espacio definido entre los espacios periportales, e incluye una vena central. El lóbulo portal está determinado por el área marcada entre tres venas centrales. El lóbulo hepático es un espacio funcional basado en el riego hemático, desde las arteriolas hepáticas hacia la vena central. Incluye 3 regiones distintas, dependiendo de la oxigenación de la sangre hepática, que

influye también sobre las características metabólicas de los hepatocitos. CV = vena central; EP = espacio periportal.

El tejido hepático es un tejido estable. Presenta una gran capacidad de regeneración en respuesta a estímulos externos, como lesiones o procesos tumorales. Sin embargo, las lesiones crónicas derivadas del alcoholismo crónico y las infecciones hepáticas provocan una pérdida constante y prolongada del parénquima. En consecuencia, el parénquima hepático es reemplazado por tejido fibroso, produciendo eventualmente cirrosis, cuando los tabiques fibrosos son interlobulillares.

1.1.2. LA COLESTASIS

La colestasis es la detención del flujo biliar. El término procede del griego *kholé*, bilis y *stasis*, acción de detenerse. El proceso colestásico se caracteriza por un impedimento en el flujo normal de bilis desde el polo canalicular del hepatocito hasta el duodeno.

La colestasis se puede observar en el contexto de distintas enfermedades tales como la hepatitis viral aguda provocada por virus A o B, infecciones sistémicas, y la enfermedad de injerto *versus* huésped en el paciente con trasplante de médula ósea. A veces, la colestasis se encuentra asociada al embarazo.

Una obstrucción de las vías hepáticas no corregida (mediante tratamiento quirúrgico o farmacológico) causa una robusta

fibrogénesis, con desarrollo de septos fibrosos, mediada por los miofibroblastos del tracto portal. Enfermedades con características histológicas específicas incluyen a la colangitis esclerosante primaria, la atresia biliar, y la cirrosis biliar primaria, que se detallará más adelante.

Cualquiera que sea la causa de la colestasis, se asocia a un aumento de las concentraciones séricas de compuestos que normalmente se excretan en la bilis, tales como los ácidos biliares, la bilirrubina y las enzimas γ -glutamyl-transpeptidasa (GGT), y fosfatasa alcalina (FA) [Pérez Fernández T. *et al.*, 2004].

La elevación de la concentración sérica de las aminotransferasas es una consecuencia de la retención de compuestos potencialmente tóxicos dentro del hepatocito. Entre los responsables principales se encuentran las sales biliares hidrofóbicas, implicadas en el desencadenamiento de procesos de apoptosis y necrosis en los hepatocitos [Rodrigues C.M., Steer C.J., 1999]. Dichos acontecimientos son también responsables del desencadenamiento de los procesos de fibrosis hepática que pueden conducir finalmente a la cirrosis [McGill J.M., Kwiatkowski A.P., 1998].

1.1.2.a. Técnicas y métodos para el diagnóstico

Las causas del síndrome de la colestasis, desde un punto de vista general, pueden ser divididas en intra y extrahepática,

basándose en la presencia o ausencia de un impedimento mecánico al flujo normal de bilis demostrable mediante métodos de imágenes convencionales (**tabla 1**).

Los exámenes de laboratorio son de gran utilidad y el patrón observado es típicamente una elevación significativa de las enzimas canaliculares. El empleo de isoformas de FA ha caído en desuso con la disponibilidad de la determinación de GGT en la mayoría de los laboratorios clínicos. La elevación de la bilirrubina sérica, de predominio directo, es variable y puede no existir. La elevación de aminotransferasas es usualmente poco significativa, aunque pueden observarse elevaciones considerables y transitorias en la colestasis aguda, disminuyendo marcadamente dentro de las primeras 24 o 48 horas.

Además de los elementos clínicos que pueden sugerir una u otra etiología, es esencial determinar si existe o no dilatación de la vía biliar; entre los recursos convencionales para su detección se encuentran la ecotomografía abdominal y la colangiografía por resonancia nuclear magnética (RNM). La utilización de marcadores de autoinmunidad específicos puede orientar el diagnóstico etiológico. En concreto, la presencia de anticuerpos anti mitocondriales (AMA) sugiere la existencia de cirrosis biliar primaria. La biopsia es también de utilidad para cuantificar el daño hepático en enfermedades como la cirrosis biliar primaria.

Tabla 1. Causas de la colestasis.

I. COLESTASIS INTRAHEPÁTICA	II. COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA
<p><u>I.a. Colestasis crónica del adulto:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Cirrosis biliar primaria. • Colangitis esclerosante. 	<p><u>II.a. Patología biliar litiasica:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Coledocolitiasis. • Síndrome Mirizzi.
<p><u>I.b. Colestasis crónica en la edad pediátrica:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Atresia de la vía biliar. • Déficit de alfa-1 antitripsina. • Displasia arteriohepática. • Enfermedad de Caroli. • Enfermedad de Byler. 	<p><u>II.b. Patología biliar benigna:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Estenosis de la vía biliar (quirúrgica, traumática, isquémica).
<p><u>I.c. Colestasis de curso agudo/subagudo:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Colestasis por drogas. • Colestasis benigna recurrente. 	<p><u>II.c. Patología biliar neoplásica:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Cáncer de páncreas. • Colangiocarcinoma. • Carcinoma ampular. • Cáncer vesicular infiltrante.
<p><u>I.d. Colestasis de curso agudo/subagudo observadas en contextos clínicos específicos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Colestasis en el curso de hepatitis viral (VHA, VHB, VHC, VHD, VHE). • Asociadas a infecciones bacterianas. • Colestasis del embarazo (colestasis gravídica). • Colestasis durante la hepatitis alcohólica. 	<p><u>II.d. Patología biliar inflamatoria:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Colangitis esclerosante. • Primaria.

1.1.3. LA FIBROSIS HEPÁTICA

La fibrosis hepática es el resultado de una lesión crónica del hígado unida a la acumulación de proteínas de la matriz extracelular (ECM); ésta es una característica de muchas enfermedades hepáticas. Las causas más importantes de fibrosis hepática en los países industrializados son el virus de la hepatitis C (HCV), el abuso de alcohol, la esteatohepatitis no alcohólica y la colestasis. La

acumulación de ECM distorsiona la arquitectura hepática formando cicatrices fibrosas, y el consiguiente desarrollo de nódulos de regeneración hepática; este cuadro se define como cirrosis. La cirrosis produce una disfunción hepatocelular, que a su vez ocasiona una insuficiencia hepática, y un incremento de la resistencia hepática al flujo hemático, provocando esta última una hipertensión portal [Ginès P. *et al.*, 2004].

La fibrosis hepática ha sido considerada durante años como un proceso pasivo e irreversible, pero en la actualidad se considera como un proceso de reparación del daño, en respuesta a una lesión hepática crónica [Albanis E., Friedman S.L., 2001]. Las principales responsables del proceso de depósito de colágeno son las células hepáticas estrelladas (HSC), descritas por primera vez en el 1851 por Toshio Ito [Reuben A., 2002]. Estas células, también conocidas como lipocitos, células Ito, o células perisinusoidales, tienen propiedades fibrogénicas. La aparición y evolución de la fibrosis hepática está influenciada por factores ambientales y genéticos [Bataller R., Brenner D.A., 2005]. En estudios epidemiológicos, se han identificado polimorfismos entre algunos genes candidatos para la progresión de la fibrosis en humanos, como el *il-1b* y el *tnf- α* [Bataller R. *et al.*, 2003].

1.1.3.a. Técnicas y métodos para el diagnóstico

La fibrosis se estudia por varias técnicas, siendo la biopsia con análisis histológico la técnica de referencia en clínica. El examen

histológico es útil para identificar las causas de la hepatopatía y para averiguar el grado necro-inflamatorio y el estadio (nivel de desarrollo) de la fibrosis. Existen escalas específicas para la evaluación del grado de fibrosis; entre ellas la escala de Meyer, con una puntuación de I a IV, y la escala de Ishak, con una puntuación de I a V. Además, como parte del examen histológico se utilizan tinciones para la ECM, como el Rojo Sirio.

Para la detección de la fibrosis hepática en la práctica normal de laboratorio, se suele incluir una serie de test bioquímicos; entre ellos el recuento de plaquetas, los niveles de aminotransferasas séricas, el tiempo de protrombina, y los niveles séricos de las proteínas de respuesta aguda [Imbert-Bismunt F. *et al.*, 2001]. Una variación del perfil plasmático de las proteínas relacionadas con los procesos fibrogénicos representa en cierta medida un marcador indirecto de la fibrosis hepática [Fontana R.J., Lok A.S., 2002]. Entre ellas destacan el pro-péptido amino-terminal del colágeno de tipo III, el ácido hialurónico, el inhibidor tisular de las metaloproteinasas (TIMP-1), y la glicoproteína de cartílago YKL-40. Sin embargo, estos parámetros son útiles para discriminar entre grados muy bajos de fibrosis, o una fibrosis muy avanzada, pero no son suficientemente sensibles en grados intermedios de desarrollo de la misma. Además, no pueden discriminar entre una fibrosis de origen hepático y una procedente de otros órganos. Por ello, en el diagnóstico actual se incluyen técnicas por imágenes, como la tomografía computerizada y la resonancia magnética nuclear [Hirata M. *et al.*, 2001].

1.1.3.b. Patogénesis de la fibrosis hepática

La fibrosis hepática es el resultado de una respuesta inflamatoria crónica y a una deposición de ECM, para reemplazar los hepatocitos necróticos o apoptóticos. En la fase inicial de la colestasis o de la infección por HCV, la fibrosis hepática se desarrolla alrededor del tracto portal, mientras que se localiza en los espacios pericentrales y perisinusoidales en la lesión hepática provocada por alcohol [Pinzani M., 1999]. Con el avance de la fibrosis, a nivel histoquímico se observa una progresión desde bandas de colágeno a puentes fibrosos, y finalmente desemboca en cirrosis cuando los tabiques fibrosos son interlobulillares.

El daño hepático puede ser ocasionado por agentes hepatotóxicos, incluyendo entre ellos el virus de la hepatitis, los metabolitos del alcohol, y los ácidos biliares. Por ellos aumenta la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), mediadores fibrogénicos, y se induce el reclutamiento de leucocitos. La apoptosis inducida en los hepatocitos dañados estimula la acción fibrogénica de los miofibroblastos hepáticos [Canbay A. *et al*, Hepatology 2004]. El infiltrado inflamatorio, que está formado tanto por linfocitos como por células polimorfonucleares, activa las HSC para producir colágeno [Casini A. *et al*, 1997]. Las HSC activadas secretan quimioquinas proinflamatorias, exponen en su membrana moléculas de adhesión celular, y modulan la activación de linfocitos [Viñas O. *et al*, 2003]. Por lo tanto, se considera que un mecanismo de alimentación positiva estimula y perpetúa la activación de HSC y la deposición de ECM.

Las HSC son las principales responsables de la producción de ECM en la lesión hepática (**Figura 2**). En el hígado normal las HSC residen en el espacio de Disse y tienen una función de depósito de vitamina A. Tras el daño crónico, las HSC se activan y se diferencian en células con características de miofibroblasto, que adquieren propiedades contráctiles, pro-inflamatorias y fibrogénicas [Milani S. *et al*, 1990].

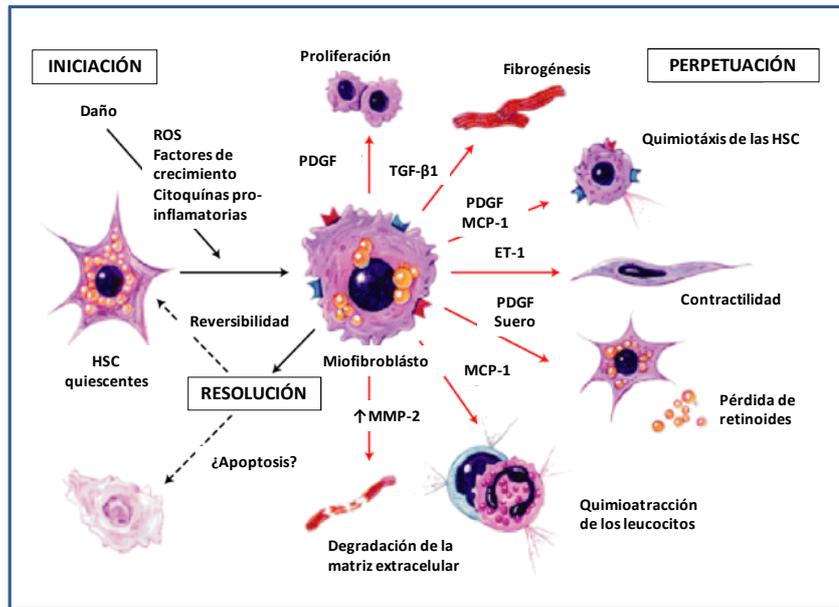


Figura 2. Características fenotípicas de la activación de las células hepáticas estrelladas durante el daño hepático y la resolución. ROS = especies reactivas del oxígeno; PDGF = factor de crecimiento derivado de las plaquetas; TGF-1 β 1 = factor de crecimiento transformante β 1; MMP-2 = metaloproteinasa de matriz; ET-1 = endotelina 1; HSC = células hepáticas estrelladas; MCP-1 = proteína quimiotáctica de los monocitos.

Múltiples factores son responsables de la activación de las HSC. Una vez activadas, las HSC migran y se acumulan en los sitios de

reparación tisular, donde secretan grandes cantidades de ECM y regulan la degradación de la misma. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), producido por las células de Kupffer, es el principal mitógeno para la activación de las HSC. Sin embargo, otros factores pueden activar las HSC (**Figura 2**), que finalmente expresarán marcadores miogénicos característicos: α -actina de músculo liso (α -SMA), el homólogo del oncogén aviar de la mieloblastosis viral (c-MYB), y el factor potenciador del miocito-2 (MEF-2) [Bataller R., Brenner D.A., 2005].

Durante el desarrollo de la fibrosis hepática, varía la composición de la ECM y su cantidad. De hecho, el hígado llega a contener alrededor de 6 veces más cantidad de colágeno (tipos I, III, IV), fibronectina, undulina, elastina, laminina, hialurónico, y proteoglicanos. La acumulación de ECM es debida a dos fenómenos principales: incremento de la velocidad de síntesis, y disminución de la degradación de la misma [Arthur M.J., 2000]. Así, conforme progresa la patología disminuye la actividad de las metaloproteinasas de matriz (MMP), enzimas encargadas de la degradación de la ECM, ya que incrementa la actividad de sus inhibidores (las TIMP). A este respecto, la sobreexpresión transitoria de MMP-1 en el hígado de rata es capaz de disminuir la fibrosis hepática inducida por tioacetamida [Iimuro Y. *et al.*, 2003]. Al contrario, la sobreexpresión de TIMP-1 en un modelo de fibrosis inducida por CCl₄ (tetraclorocarbono), es contraproducente sobre la resolución espontánea de la fibrosis [Yoshiji H. *et al.*, 2002]. Sin embargo, existe cierta controversia, ya que durante fases tempranas del desarrollo de la fibrosis secundaria a colestasis extrahepática,

MMP-13 es causa del daño hepático, de la inflamación, y de la activación de HSC [Uchinami H. *et al.*, 2006].

La regulación de MMP y TIMP depende de varios mecanismos dependientes de la liberación de citoquinas y de la activación de factores de transcripción. TGF-1 β es una citoquina que tiene una importante implicación en la promoción de la fibrosis hepática [Ueberham E. *et al.*, 2003]. Su regulación negativa es capaz de disminuir la expresión de *timp-1*, y de incrementar la expresión de *mmp-2* y *mmp-13* [Arendt E. *et al.*, 2005]. TGF-1 β tiene además la capacidad de reprimir la transcripción de MMP-9 desde su promotor. El mecanismo de acción es a través de un sitio de reconocimiento para p50 y p65/RelA, subunidades del factor nuclear κ B (NF- κ B), en el promotor de MMP-9. Por lo tanto, la acción sinérgica de TGF-1 β y NF- κ B son responsables de promover las señales fibrogénicas en monocitos y macrófagos [Ogawa K. *et al.*, 2004].

Sin embargo, RelA podría tener un efecto anti-fibrótico en el hígado, ya que su expresión tiene una correlación inversa con el grado de desarrollo de la fibrosis, tal como se ha encontrado en pacientes con HCV [Boya P. *et al.*, 2001]. Estos resultados son coherentes con una disminución de la producción de colágeno de tipo I en fibroblastos NIH 3T3 y en HSC transfectadas con un plásmido de expresión para p65/RelA [Rippe R.A., *et al.*, 1999]. Todos estos resultados permiten hipotetizar que p65/RelA es responsable del bloqueo de la síntesis y de la eliminación de la ECM.

1.1.4. LA CIRROSIS BILIAR PRIMARIA

La cirrosis biliar primaria (CBP) es una enfermedad crónica, de etiología generalmente desconocida, aunque en la mayoría de los casos su origen es autoinmune. La CBP se caracteriza por la inflamación y destrucción de los conductos biliares intrahepáticos. Ello determina la presencia de alteraciones de laboratorio compatibles con la colestasis. Las manifestaciones clínicas principales son prurito, ictericia, presencia de xantomas y xantelasmas [Lleo A. *et al.*, 2008].

La forma de presentación clínica más frecuente corresponde a la aparición de prurito como síntoma cardinal, seguido meses o años más tarde por ictericia [Talwalkar J.A. *et al.*, 2003]. La evolución clínica puede ser estable durante mucho tiempo hasta que se manifiesta un cuadro clínico completo de colestasis crónica. Además del aumento de la actividad GGT, la FA se encuentra significativamente elevada. La bilirrubinemia suele estar dentro de los valores normales al inicio de la enfermedad, pero puede elevarse hasta niveles muy significativos con la progresión de la misma. También puede observarse un aumento, a veces considerable, de los niveles de colesterol en el plasma. Las transaminasas están por lo general sólo ligeramente elevadas. La concentración sérica de albúmina y la tasa de protrombina suelen ser normales en las fases iniciales, y sólo se deterioran con la progresión de la enfermedad. Puede observarse también una hipergammaglobulinemia debida a un

aumento de la fracción IgM. La IgG también suele estar elevada, pero los niveles de IgA suelen ser normales [Benson G.D. *et al.*, 2004].

Los anticuerpos antimitocondriales (AMA) son anticuerpos dirigidos a un complejo multienzimático localizado en la mitocondria. En la cirrosis biliar primaria (CBP) casi el 90% de los pacientes presenta anticuerpos antimitocondriales (AMA) [Tanaka A, *et al.*, 2002; Zhang FK, *et al.*, 2004]. Por ello, la aparición de AMA se considera un marcador específico de la enfermedad. Sin embargo, en otro grupo de pacientes que poseen todas las características de esta enfermedad, no se les detecta los AMA. Otro subgrupo de pacientes posee algunas características propias de la hepatitis autoinmune, lo que se denomina síndrome de sobreposición (*overlapping syndrome*).

La realización de una biopsia hepática no es estrictamente necesaria para establecer el diagnóstico, pero aporta información pronóstica relevante. La CBP suele afectar a mujeres (relación mujeres: hombres 9: 1), entre los 40 y los 60 años, no existiendo evidencias epidemiológicas sólidas que permitan afirmar que la enfermedad sea hereditaria ni que afecte a determinados grupos étnicos o sociales. Histológicamente se distinguen cuatro estadios que incluyen desde el hígado sano hasta la fase final de cirrosis (I = hepatitis portal, II = hepatitis periportal, III = aparición de tabiques necróticos o fibróticos, o ambos, IV = cirrosis) [Ludwig J., *et al.*, 1978]. Su patogenia es desconocida, sin embargo, la frecuente asociación con enfermedades autoinmunes, así como la presencia de autoanticuerpos y de numerosas alteraciones de la

inmunorregulación sugieren que la lesión hepática es de naturaleza autoinmune.

El tratamiento de la CBP se basa en prevenir o aliviar los síntomas y las consecuencias de la colestasis crónica, y detener en lo posible el daño de los conductos biliares para prevenir la progresión de la enfermedad. El prurito puede ser un síntoma difícil de manejar, y se han utilizado muchos tratamientos con resultados poco consistentes. La administración de colestiramina puede ser de utilidad, en dosis inicial de 4 g/día, para aumentarla según la eficacia hasta 16 g diarios. El empleo de ácido ursodesoxicólico (UDCA) puede prevenir la progresión de la enfermedad, a pesar de que no está firmemente establecido que influya sobre la supervivencia. Los claros beneficios sobre la clínica, la bioquímica, y especialmente la prevención de la progresión histológica, son razones suficientes para su utilización como terapéutica estándar en la CBP. La dosis recomendada es de 13-15 mg/kg/día. En etapas avanzadas de la enfermedad se debe considerar el trasplante hepático como terapia definitiva.

1.2. MODELO EXPERIMENTAL DE CIRROSIS BILIAR INDUCIDA POR COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA CRÓNICA

Las causas principales de la colestasis obstructiva extrahepática son los cálculos biliares y los tumores, benignos o

malignos, que actúan como impedimento mecánico del flujo de bilis hacia el intestino. *In vivo*, los modelos experimentales más estudiados se basan en la obstrucción total o parcial de los conductos biliares. Para ello, se practica la ligadura del ducto biliar común (CBDL o simplemente BDL, *common bile duct ligation*) o la ligadura de uno de los dos ductos biliares – derecho o izquierdo – (PBDL, *partial bile duct ligation*) [Rodríguez-Garay, 2003]. Dichos modelos se caracterizan por una alteración del transporte de sales biliares [Rodríguez-Garay, 2003], el desarrollo de fibrosis [Milani S. *et al.*, 1990] y, en estadios más tardíos, la cirrosis biliar [Serviddio G. *et al.*, 2004].

Los conocimientos actuales sobre la colestasis extrahepática inducida por ligadura del ducto biliar muestran una alteración de la expresión de proteínas canaliculares de la membrana plasmática, debido a la degeneración de la ruta de transporte vesicular, y también a la pérdida de la integridad de las *tight junctions*. La colestasis obstructiva se caracteriza por la retención de la bilis en los ductos hepáticos, la hipertensión y la expansión portal, la proliferación de los ductos biliares, y la lesión centrilobular [Rodríguez-Garay, 2003]. A dichas modificaciones se asocian trastornos metabólicos – alteración del metabolismo de los ácidos grasos y de los cuerpos cetónicos [Lang C. *et al.*, 2001] – y pérdida de la función mitocondrial [Huang Y.T. *et al.*, 2003], que a su vez está asociada a una mayor producción de especies reactivas del oxígeno [Serviddio G. *et al.*, 2004].

1.2.1. LA FIBROSIS EN LA COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA EXPERIMENTAL

El modelo de colestasis extrahepática inducida por ligadura del ducto biliar común se caracteriza por un desarrollo rápido de la fibrosis. A los 2 días de la ligadura se aprecia una deposición de tenascina en la matriz que rodea los ductos biliares interlobulares y también los ductulos proliferantes [Miyazaki H. *et al.*, 1993]. La tinción con rojo Sirio permite observar evidentes cambios ultraestructurales a los 14 días, característicos de una incrementada producción de colágeno. Al mismo tiempo, es evidente el marcado incremento de α -SMA en cortes de hígado, mediante la técnica de inmunohistoquímica [Georgiev P. *et al.*, 2008]. A los 21 días de la ligadura, el hígado tiene aspecto típicamente fibrótico con tabiques interlobulillares.

Determinaciones histológicas hechas en tejido hepático de rata muestran importantes signos de fibrosis a los 28 días de la intervención, asociada además a la aparición de nódulos de regeneración típicos de la cirrosis [Serviddio G. *et al.*, 2004]. Además de los cambios morfológicos, son relevantes los cambios funcionales del órgano. Entre ellos destaca el rápido desarrollo de hipertensión portal [Yokoyama Y. *et al.*, 2003], que provoca un marcado trastorno microcirculatorio y una alteración metabólica [Forestier M. *et al.*, 1997].

1.2.2. EL TRASTORNO METABÓLICO EN LA COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA EXPERIMENTAL

Una característica muy relevante de la colestasis es la alteración del metabolismo hepático. En conejos colestásicos, se observa un rápido incremento de la fosforilación oxidativa mitocondrial, seguido de una marcada disminución después de 3 horas de la ligadura del ducto biliar [Ozawa K. *et al.*, 1979]. Estos primeros eventos tienen una importante relevancia a nivel metabólico. En ratas con colestasis crónica, se observa una disminución del metabolismo de los ácidos grasos; una defectuosa oxidación de los ácidos grasos es además responsable de una disminuida cetosis en condiciones de ayuno [Krähenbühl S. *et al.*, 1994].

En el mismo modelo de colestasis, se observa una disminución de la concentración plasmática de acetilcarnitina y de la concentración hepática de β -hidroxibutirato. Estos resultados muestran una disminución de la síntesis de cuerpos cetónicos y de la eliminación de acetilcarnitina en ratas BDL. La práctica quirúrgica de la anastomosis Roux-en-Y no revierte dicha alteración en un plazo de 14 días [Wächter S. *et al.*, 1999]. El mismo grupo, en otros experimentos, averiguó que la disminución de la concentración de cuerpos cetónicos era observable ya a los 5 y 10 días en ratas BDL, transcurridas 24 horas de ayuno. La causa es el decremento de la actividad, de la expresión del gen y del nivel de proteína de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A sintasa (HMG-CoA), enzima limitante en la síntesis de los cuerpos cetónicos [Lang C. *et al.*, 2001].

En ratas con colestasis crónica se observa además una disminución de la enzima CPT-II (carnitin-palmitoiltransferasa), asociada con una disminución del metabolismo mitocondrial y una disminuida activación del palmitato. Estos cambios son reversibles en un periodo de 3 meses tras restablecer el flujo de bilis por la anastomosis de Rou-en-Y [Lang C. *et al.*, 2002].

1.2.3. RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL EN LA COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA EXPERIMENTAL

La respiración mitocondrial en ratas BDL está deteriorada. En conejos, 24 horas después de inducir la colestasis, se observa una disminución de la concentración de ADP libre, de la velocidad máxima de síntesis de ATP y del gasto de energía para producir ATP en la mitocondria [Tanaka A. *et al.*, 1995]. La determinación polarográfica de la actividad respiratoria en mitocondrias aisladas demuestra ya una disminución del control respiratorio (RCR, cociente entre estado 3 y estado 4 de la respiración mitocondrial) a las dos semanas desde la inducción de la colestasis; transcurridas 4 semanas los cambios son todavía más evidentes [Huang Y.T. *et al.*, 2003]. Sin embargo, hay controversia sobre el deterioro de la función mitocondrial en una fase temprana, ya que otros autores no describen una disminución del RCR tras 2 semanas de colestasis en ratas [Krähenbühl L. *et al.*, 1998].

En otro estudio se confirma el deterioro de la función mitocondrial en periodos más largos. De hecho, a las 5 semanas de

colestasis se observa una disminución de oxidación de sustrato en estado 3, utilizando β -hidroxibutirato o succinato como sustratos [Krähenbühl S., *et al.*, 2002]. Esto muestra que el daño mitocondrial en la colestasis es progresivo y no es reversible. El decremento de la oxidación de dichos sustratos se observa también en mitocondrias desacopladas con dinitrofenol. Se observó que dichas alteraciones están relacionadas con un mayor contenido de colesterol en la membrana mitocondrial interna [Krähenbühl S. *et al.*, 1992].

La respiración mitocondrial se ve alterada en ratas BDL 4 semanas después de la ligadura del ducto biliar. De hecho, se observa una disminución de la respiración mitocondrial utilizando distintos sustratos (L-glutamato, succinato, duroquinol, ascorbato) [Krähenbühl L. *et al.*, 1998]. Estos resultados están confirmados por otros autores, utilizando el succinato como sustrato para medir la respiración mitocondrial a partir del complejo II, o el glutamato-malato para medir la respiración mitocondrial a partir del complejo I [Huang Y.T. *et al.*, 2003].

La pérdida de funcionalidad mitocondrial se observó también por el decremento del cociente ADP/O y por la marcada reducción de la actividad de las enzimas NADH-citocromo *c* reductasa y succinato-citocromo *c* reductasa a los 28 días de la ligadura del ducto biliar. Contrariamente a lo que se esperaba, no se evidenciaron cambios en la actividad de la citocromo *c* oxidasa [Huang Y.T. *et al.*, 2003]. En otro estudio, todavía no se observa la disminución del cociente ADP/O en ratas a los 28 días de la ligadura del ducto biliar [Krähenbühl L. *et al.*, 1998].

1.2.4. EL DAÑO OXIDATIVO Y NITROSATIVO EN LA COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA EXPERIMENTAL

La evidencia experimental apoya la implicación del daño oxidativo en el transcurso de la cirrosis biliar experimental [Alptekin N. *et al.*, 1997]. Una característica de la enfermedad es el incremento del glutatión oxidado (GSSG), así como del cociente GSSG/GSH [Ebrahimkhani M.R. *et al.*, 2005; Serviddio G. *et al.*, 2004], y de los niveles de malondialdehido (MDA) en hígado y en plasma [Baron V., Muriel P., 1999] además de la oxidación del ADN nuclear [Kitada T. *et al.*, 2001].

En relación a los niveles de glutatión reducido (GSH), los resultados muestran una respuesta bifásica. Se ha observado un leve incremento de los niveles hepáticos y plasmáticos a los 7 días de la ligadura [Baron V., Muriel P., 1999; Ebrahimkhani M.R. *et al.*, 2005], que retorna a los niveles de control a los 14 días post-ligadura [Ebrahimkhani M.R. *et al.*, 2005] y decrece a los 21 y 28 días [Serviddio G. *et al.*, 2004; Ebrahimkhani M.R. *et al.*, 2005]. Por tanto, es probable que se induzcan las enzimas responsables de la síntesis de GSH en periodos cortos de tiempo: la hipótesis es coherente con un incremento paralelo del nivel de GSSG observado a los 7 días, sin que descendan (o incluso aumenten) los niveles de GSH [Ebrahimkhani M.R. *et al.*, 2005].

En periodos más largos, la disminución de GSH hepático se produce por dos mecanismos independientes: por un lado, la disminución de la expresión del gen que codifica para la γ -GCS a los

21 días de colestasis [Serviddio G. *et al.*, 2004], y por otro lado, la oxidación del GSH a GSSG [Ebrahimkhani M.R. *et al.*, 2005; Serviddio G. *et al.*, 2004]. La administración diaria de UDCA (ácido ursodeoxicólico) en ratas puede restablecer los niveles fisiológicos del ARN mensajero de la γ -GCS y mejorar el estado redox del glutatión [Serviddio G. *et al.*, 2004].

El estrés oxidativo observado en el modelo de cirrosis experimental afecta a la mitocondria [Alptekin N. *et al.*, 1997]. Una de las causas principales de las alteraciones del estado redox parece ser el aumento de la concentración de sales biliares hidrófobas. Así, experimentos *in vitro* han demostrado un incremento en la producción de peróxidos (por las mitocondrias) en hepatocitos sometidos a distintas concentraciones de ácidos biliares. Además, los autores mostraron que las sales biliares hidrófobas son las principales responsables de incrementar la producción de peróxidos [Sokol R.J. *et al.*, 1993; Sokol R.J. *et al.*, 1995].

Durante el desarrollo de la colestasis hepática se manifiesta una hipertensión portal, que eventualmente conlleva el desarrollo de ascitis, el cual parece estar asociado a una alteración de la función endotelial, con incremento de las sustancias vasoconstrictoras. Por ello, una defectuosa regulación de la producción del óxido nítrico, producido por las enzimas óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y la forma inducible (iNOS), podría estar implicada en la hipertensión portal en la cirrosis. Estudios en ratas BDL describen una regulación variable en la expresión de eNOS a lo largo del desarrollo de la fibrosis. En la tercera semana de BDL se observa una disminución de

la forma constitutiva de la NOS (cNOS, que en hígado corresponde a la eNOS), medida por técnica inmunohistoquímica [Zimmermann H, *et al.*, 1996]. Sin embargo, otros autores muestran un incremento de cNOS a nivel de ARNm a los 22-26 días, que no se refleja en un incremento de la proteína [Wei C.L. *et al.*, 2002]. La actividad de la forma calcio-dependiente de la NOS (cNOS) disminuye en ratas BDL a los 21-26 días post-ligadura [Wei C.L. *et al.*, 2005b; Wei C.L. *et al.*, 2002]. La disminución de la actividad de eNOS durante la colestasis también está confirmada en muestras hepáticas humanas; sin embargo los niveles de proteína no descienden, indicando que la actividad de esta enzima en la colestasis está modulada por mecanismos de inactivación [McNaughton L. *et al.*, 2002].

La expresión del transcrito de la forma inducible es detectable ya a los 3 días post-ligadura, la cual aumenta hasta las 3 semanas, y luego desciende. La abundancia proteica, determinada por *western-blot*, sigue un patrón similar [Wei C.L. *et al.*, 2005a]. En otro estudio se observa un incremento de la enzima iNOS en ratas BDL a los 22-26 días [Wei C.L. *et al.*, 2002]. Sin embargo, la actividad de la enzima disminuye entre los días 3 y 7, para luego aumentar hasta los 21 días [Wei C.L. *et al.*, 2005a; Wei C.L. *et al.*, 2005b], y a los 26 días [Wei C.L. *et al.*, 2002].

Es todavía relevante mencionar que, independientemente de los niveles de expresión de la enzima eNOS o iNOS, y su localización y redistribución en las células hepáticas, los niveles de NO sistémico aumentan hasta la cuarta semana [Wei C.L. *et al.*, 2005a; Wei C.L. *et al.*, 2005b]. En base a estos resultados, se podría pensar que la

producción de óxido nítrico y sus metabolitos - NO_2^- , NO_3^- y peroxinitrito - puede tener un papel importante en la regulación de la función endotelial, pero también en la modificación post-traducciona de proteínas y en la liberación de segundos mensajeros, como el cGMP.

1.3.LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL

En Biología, la “biogénesis” es un principio según el cual un ser vivo proviene siempre de otro ser vivo, oponiéndose así a la generación espontánea. La expresión “biogénesis mitocondrial” se refiere a una serie de procesos celulares involucrados en la formación de nuevas mitocondrias. El proceso de síntesis se caracteriza por una serie de rápidos acontecimientos altamente coordinados entre núcleo, citoplasma y mitocondria, cuyos efectos fisiológico-metabólicos sólo son evidentes en el periodo de unas semanas. En cada paso se distinguen varios mecanismos reguladores, entre los cuales destacan la concentración de calcio, de ATP, y la activación de fosforilasas y/o fosfatasas.

De alrededor de 1000 proteínas mitocondriales, aproximadamente el 99% están codificadas por el genoma nuclear. Tras traducir los transcritos de dichos genes en los ribosomas citoplasmáticos, la nueva proteína se traslada a la mitocondria gracias a distintos mecanismos de *import*, citoplasmáticos y mitocondriales. El resto de las proteínas mitocondriales están

codificadas por genes mitocondriales, que se transcriben a partir del ADNmt y se traducen en los ribosomas mitocondriales. En una condición de restricción calórica o durante ejercicio físico, la mitocondria experimenta cambios más rápidos, para adaptarse a la nueva necesidad metabólica.

En patologías hepáticas, como la cirrosis alcohólica, la colestasis, o la esteato hepatitis no alcohólica (NASH), el funcionamiento de las mitocondrias está alterado. Entre las posibles causas, destaca la nitrosilación de algunos complejos respiratorios, como está descrito en la NASH [García-Ruiz I. *et al.*, 2006], y un elevado estrés oxidativo, como en la colestasis extrahepática [Serviddio G. *et al.*, 2004; Huang Y.T. *et al.*, 2003]. Sin embargo, en la cirrosis biliar primaria se promueve la biogénesis mitocondrial, con incremento de la expresión de NRF-1 y TFAM, pero se observa una disminución de la expresión de PGC-1 α [Chen C.H. *et al.*, 2005]. Todavía no se conoce si la inducción de la biogénesis mitocondrial es eficiente en la cirrosis hepática, y si el estímulo de regeneración de las mitocondrias dañadas es común a la colestasis o específica de la cirrosis biliar primaria.

1.3.1. LA BIOGENESIS MITOCONDRIAL REQUIERE LA COOPERACIÓN DEL GENOMA NUCLEAR Y MITOCONDRIAL

La síntesis de todas las proteínas que sirven para el funcionamiento de la mitocondria (enzimas de la cadena de

transporte mitocondrial) requiere la expresión de los productos de genes codificados por el genoma nuclear y mitocondrial [Scarpulla R.C., 2002b]. La correcta expresión de genes mitocondriales y nucleares se regula coordinadamente por una serie de factores de transcripción, codificados por genes nucleares. Estos factores de transcripción se pueden dividir en tres grupos. La primera clase incluye factores codificados por el núcleo que dirigen la expresión de genes respiratorios nucleares. Entre ellos encontramos el factor respiratorio nuclear 1 (NRF-1), el factor de unión a secuencias ricas en GA (GABP- α en *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*, y NRF-2 en *Homo sapiens*) y el receptor relacionado con los estrógenos (ERR- α). La segunda clase está compuesta por coactivadores, que forman complejos con los factores de transcripción y facilitan el remodelamiento de la cromatina. En este grupo los más importantes son los de la familia de los coactivadores de los PPAR (receptor activado por el proliferador de los peroxisomas): PGC-1 α , su coactivador relacionado (PRC), y PGC-1 β . Destaca que estos coactivadores están regulados fisiológicamente a nivel de expresión y a nivel de interacción con factores de transcripción específicos.

La tercera clase incluye a factores de transcripción de codificación nuclear, que promueven la expresión de genes mitocondriales. Estos incluyen el factor de transcripción-A mitocondrial (TFAM, nombre alternativo TCF6/mTFA), el factor de transcripción mitocondrial B1 (*TFB1M*) y el TFB2M, la proteína de unión a ADN de hebra única (mtSSB), y un factor de terminación de la transcripción (mTERF). Todos los anteriores tienen la capacidad de

regular la actividad de la ARN gamma-polimerasa (RNA POL- γ), es decir la polimerasa mitocondrial.

De esta forma, el programa de expresión de genes de la cadena respiratoria se completa por una compleja interacción de factores de transcripción y sus coactivadores que actúan a nivel nuclear, y factores de transcripción que actúan a nivel mitocondrial (Figura 3).

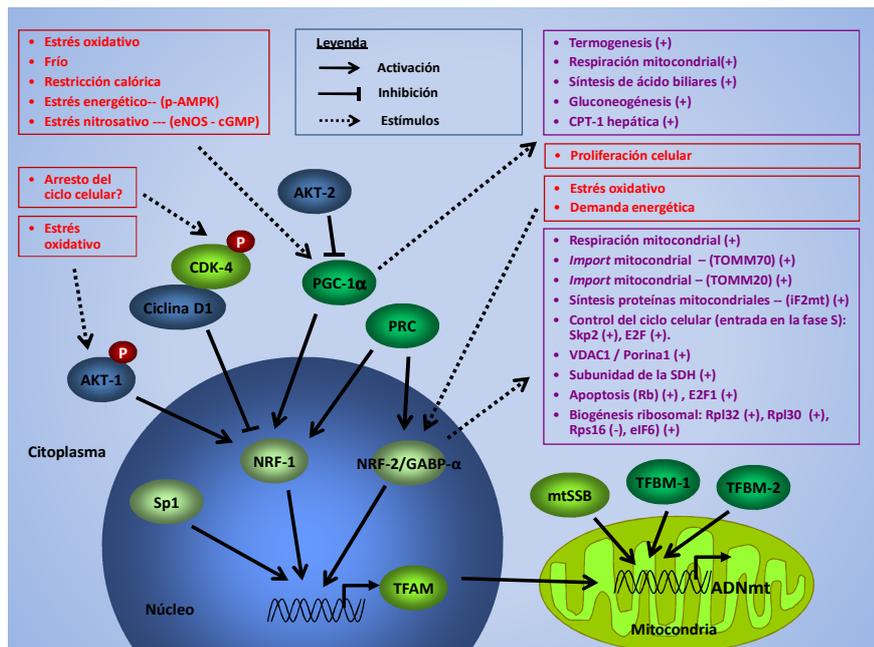


Figura 3. Biogénesis mitocondrial: integración de señales entre el genoma nuclear y mitocondrial. Las flechas sólidas (↑) muestran señales de activación directa sobre la transcripción o la fosforilación de otra proteína. Las líneas con remate perpendicular (⊥) muestran mecanismos de inhibición. Las flechas con línea discontinua (---) muestran estímulos activadores de una función/proceso metabólico. P = fosforilación. Para los nombres de las proteínas véase “abreviaturas”.

1.3.2. REGULACIÓN DE LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL A NIVEL NUCLEAR: NRF-1, GABP- α Y PGC-1 α Y SUS RUTAS DE ACTIVACIÓN

Mecanismos específicos de señalización promueven la activación de factores de transcripción involucrados en la biogénesis mitocondrial. Las principales vías son dependientes de la activación de la ruta de las MAP quinasas [Akimoto T. *et al.*, 2005], de ciclinas [Wang C. *et al.*, 2006], de la proteína quinasa activada por el 5'AMP (AMPK, *5'AMP-activated protein kinase*) [Bergeron R. *et al.*, 2001], el estrés oxidativo [Suliman HB, *et al.*, 2004], la señalización por el cGMP [Nisoli E. *et al.*, 2003], o la activación de CREB [Herzig R.P. *et al.*, 2000], entre otros.

A continuación se describen en más detalle los factores de transcripción y los principales coactivadores implicados en la regulación de la biogénesis mitocondrial.

1.3.2.a.NRF-1

NRF-1 actúa sobre la mayoría de genes requeridos para la función respiratoria mitocondrial [Scarpulla R.C. 2002a], y es esencial para la vida. Ratones *knockout* del gen de *nrf-1* presentan defectos neurológicos o muerte embrionaria [Chan J.Y. *et al.*, 1998; Huo L., Scarpulla R.C., 2001]. Los blastocistos *knockout* de *nrf-1* no crecen a pesar de tener una morfología normal y un ADNmt intacto; sin embargo, muestran alteraciones del potencial de membrana y una

depleción del ADNmt [Huo L., Scarpulla R.C., 2001]. Es posible que la depleción de ADNmt se deba a mecanismos de mantenimiento del ADNmt dependientes de NRF-1. Posiblemente NRF-1 afecta a la expresión de genes de control del crecimiento, y del desarrollo celular. Mediante la combinación de inmunoprecipitación de cromatina y *microarrays* fue posible identificar 691 promotores (conjunto de partida: 13.000 genes) que tienen sitios de reconocimiento para NRF-1. La mayoría de estos genes están implicados en la biogénesis mitocondrial y el metabolismo. Se descubrió también que NRF-1 regula la expresión de varios genes regulados por E2F, demostrando una posible implicación en la proliferación celular [Cam H. *et al.*, 2004].

NRF-1 fue el primer factor nuclear en descubrirse que actúa como regulador positivo de la transcripción de los genes que codifican para el citocromo *c* (*cycs*) [Herzig R.P. *et al.*, 2000] y la citocromo *c* oxidasa (*cox*) [Ongwijitwat S., Wong-Riley M.T., 2004]. Tiene la característica de unirse como homodímero a un sitio de reconocimiento palindrómico del promotor de citocromo *c* [Gugneja S., Scarpulla R.C., 1997]. NRF-1 controla además la expresión de las 10 subunidades de la citocromo-*c* oxidasa (*cox*) [Virbasius J.V. *et al.*, 1993; Dhar S.S. *et al.*, 2008], directa o indirectamente, ya que puede controlar la expresión del factor de transcripción *mef-2a*, a su vez regulador de la expresión de *cox-VIa* y *cox-VIIa* [Ramachandran B. *et al.*, 2008]. NRF-1 tiene también un papel en la síntesis de ATP, ya que regula la expresión de la gamma-ATP sintasa (*atp-gs*) [Chau C.M. *et al.*, 1992], en el *import* de proteínas mitocondriales regulando la expresión del receptor mitocondrial *tomm70* [Blesa J.R., Hernández-

Yago J., 2006], en la síntesis del grupo hemo, ya que promueve la transcripción de la δ -aminolevulinato sintasa (*alas*) [Li B. *et al.*, 1999], y en el ensamblaje, la traducción y transporte de proteínas mitocondriales [Cam H. *et al.*, 2004]. Estudios realizados mediante inmunoprecipitación de cromatina *in vivo* demuestran que NRF-1 actúa sobre un gen clave para el control de la maquinaria de transcripción y el mantenimiento del ADNmt, TFAM (*alias* mTFA/TCF6) [Virbasius JV, Scarpulla RC., 1994; Piantadosi C.A., Suliman H.B., 2006].

NRF-1 tiene una regulación transcripcional y post-traduccional. A nivel transcripcional, se observa un incremento de su expresión en respuesta a la restricción calórica [Nisoli E. *et al.*, 2005] o el ejercicio físico [Gomez-Cabrera MC. *et al.*, 2008]. Sin embargo, NRF-1 está rápida y eficazmente regulado por translocación nuclear y modificación post-traduccional. Entre las principales vías de activación de NRF-1 destacan el estrés (déficit) energético y el estrés oxidativo. El desequilibrio energético promueve la activación de la enzima AMPK, y a su vez la fosforilación de NRF-1, que aumenta su capacidad de unión al ADN [Bergeron R. *et al.*, 2001; Fu X. *et al.*, 2008]. El estrés oxidativo inducido por tert-butil-hidroperóxido (T-BOOH) promueve la fosforilación (activación) de NRF-1 por la enzima AKT, y la migración al núcleo, fenómeno asociado a mayor capacidad de transactivación de genes nucleares [Piantadosi C.A., Suliman H.B., 2006; Suliman H.B. *et al.*, 2003]. Asimismo, el estrés oxidativo producido por el ejercicio físico promueve la biogénesis mitocondrial, que se revierte por la administración diaria de una dosis elevada de vitamina C [Gomez-Cabrera MC. *et al.*, 2008].

La fosforilación de NRF-1 en múltiples residuos de serina en su dominio amino-terminal promueve un incremento de la unión a ADN [Gugneja S., Scarpulla R.C., 1997] y de las funciones de transactivación [Herzig R.P. *et al.*, 2000]. Al contrario, experimentos hechos en pollos demuestran que la glicosilación de NRF-1 puede tener una función de regulación negativa sobre la transcripción [Gomez-Cuadrado A. *et al.*, 1995]. La regulación negativa de NRF-1 es de gran relevancia sobre la biogénesis mitocondrial. El complejo proteico ciclina D1 / CDK-4 (quinasa dependiente de ciclina 4) es capaz de fosforilar NRF-1, inhibiendo así su capacidad de transactivación del gen de TFAM [Wang C. *et al.*, 2006].

1.3.2.b. GABP- α /NRF-2 α

Otro importante factor nuclear implicado en la biogénesis mitocondrial es GABP- α /NRF-2 α . Este factor de transcripción está compuesto por 4 subunidades, que incluyen una subunidad α de unión al ADN y otras 4 (β 1, β 2, γ 1, γ 2), que por sí solas no se unen al ADN. NRF-2 es un homólogo de la proteína de ratón y rata GABP. GABP- α tiene un papel esencial para la vida: los ratones *knockout* de *gabp- α* muestran letalidad peri-implantatoria [Ristevski S. *et al.*, 2004]. Posibles alteraciones ocasionadas por una disminución o depleción de los niveles de GABP- α son la desregulación del ciclo celular [Yang Z.F. *et al.*, 2007] y defectos en la biogénesis mitocondrial [Scarpulla R.C., 1997]. Ambas tienen un papel fundamental en la regulación del funcionamiento celular.

NRF-2 α es un activador de varios genes reguladores de la cadena respiratoria mitocondrial, como *tfam*, *tfb1m*, *tfb2m* [Gleyzer N. *et al*, 2005] y 3 de las 4 subunidades de la succinato deshidrogenasa (complejo II) [Au H.C., Scheffler I.E., 1998]. Recientemente, GABP- α se identificó como activador de la expresión de las 10 subunidades nucleares de la citocromo c oxidasa (COXIV) [Ongwijitwat S. *et al*, 2006]. Su relevancia en la regulación de la biogénesis mitocondrial se extiende también a la activación del promotor de receptores clave para el *import* de proteínas a través de la membrana mitocondrial externa: *tomm20* [Blesa J.R., Hernández-Yago J., 2007] y *tomm70* [Blesa J.R. *et al*, 2006].

1.3.2.c.ERR- α

El receptor ERR- α está implicado en la regulación del metabolismo oxidativo. ERR- α es miembro de una familia de receptores nucleares huérfanos, que incluye ERR- β y ERR- γ . Este tipo de receptores, en ausencia de hormona, se une a su secuencia específica de ADN inactivando un gen. Cuando se activan por las hormonas, se activa la transcripción de genes que estaban reprimidos. ERR- α tiene características parecidas al receptor de estrógenos, pero no se une a estrógenos u otros ligandos. Los niveles de ERR α están altos en tejidos oxidativos, como el riñón, el corazón y el tejido adiposo marrón, y actúa como regulador de la β -oxidación controlando el promotor de la acil-coenzima A deshidrogenasa de cadena media (MCAD) [Vega R.B. *et al*, 2000]. La isoformas α y γ aumentan en el periodo postnatal en corazón conjuntamente a

enzimas que promueven el *uptake* y oxidación de ácidos grasos a nivel mitocondrial.

Estudios recientes han demostrado la implicación de ERR- α en la biogénesis mitocondrial inducida por PGC-1 α [Lin J. *et al.*, 2004]. De hecho, ratones *knockout* del gen *ppargc-1 α* (gen que codifica PGC-1 α) muestran niveles más bajos del ARNm de *err- α* . Animales dominantes negativos para el gen *err-a* son viables y fértiles y no se ha demostrado una disminución en la ingesta calórica o en el gasto energético [Luo J. *et al.*, 2003]. Es importante destacar que tanto PGC-1 α como ERR- α regulan el metabolismo del tejido adiposo, ya que en ambos casos la delección del gen (*ppargc-1 α* o *err- α*) produce un fenotipo con reducido contenido de masa grasa corporal, y una menor lipogénesis en respuesta a dieta con alto contenido en grasa, comparado con ratones control [Luo J. *et al.*, 2003].

1.3.3. COACTIVADORES EN LA REGULACIÓN DE LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL

La regulación de genes de la cadena respiratoria mitocondrial y del metabolismo oxidativo depende principalmente de NRF-1, GABP- α y ERR- α . La actividad de dichos factores está finamente regulada por modificaciones post-traduccionales, por la actividad de coactivadores y por modificaciones epigenéticas. Hasta la fecha se ha descrito una familia de coactivadores que tienen un papel importante en la regulación de la biogénesis mitocondrial. PGC-1 α , el primero en

descubrirse por medio de experimentos de doble híbrido en levadura por el grupo de Spiegelman [Castillo G. *et al*, 1999], es un potente transactivador de NRF-1. Otros miembros de esta familia de coactivadores están compuestos por PGC-1 β y PRC.

1.3.3. α .PGC-1 α

PGC-1 α fue el primer miembro en descubrirse de una familia de coactivadores transcripcionales que tienen una importante función integradora en la orquestación de un programa de biogénesis mitocondrial. PGC-1 α es el coactivador natural de NRF-1. Tiene varias funciones sobre el metabolismo de la glucosa [Herzig S. *et al*, 2001; Rodgers J.T. *et al*, 2005], la termogénesis [Puigserver P. *et al*, 1998], la síntesis de ácidos biliares [Shin D.J. *et al*, 2003] y la regulación del ciclo circadiano [Liu C. *et al*, 2007], entre otras. PGC-1 α tiene la capacidad de interactuar con PPAR γ en el tejido adiposo marrón; además, puede unirse a varios receptores hormonales nucleares y puede transactivar la expresión del promotor de *ucp-1* (proteína desacoplante 1) [Puigserver P. *et al*, 1998].

La expresión ectópica de PGC-1 α en mioblastos en cultivo estimula la biogénesis mitocondrial [Wu Z. *et al*, 1999]. Induce la expresión de algunas subunidades respiratorias, entre las cuales la subunidad IV de la citocromo oxidasa (*cox-IV*), la subunidad β de la ATP sintasa (*atpb*) y el citocromo c (*cycc*). Estos cambios coinciden con un incremento en el consumo de oxígeno en miotubos diferenciados y un marcado incremento en el número de

mitocondrias. PGC-1 α interactúa con NRF-1 y puede transactivar los genes diana de NRF-1 involucrados en la respiración mitocondrial. En experimentos en células con dominantes negativos del alelo de *nrf-1*, no se observa un efecto de PGC-1 α sobre la biogénesis mitocondrial [Wu Z. *et al.*, 1999].

Sin embargo, en presencia de NRF-1, PGC-1 α tiene la capacidad de inducir genes de la cadena de transporte mitocondrial, la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos y de la ruta de biosíntesis del grupo hemo. La oxidación de los ácidos grasos en el tejido adiposo marrón está catalizada por enzimas específicas activadas por PPAR α . La unión ligando-dependiente de PGC-1 α a PPAR- α determina la transactivación de los promotores dependientes de PPAR- α [Vega R.B. *et al.*, 2000]. Con un mecanismo similar, PGC-1 α puede utilizar NRF-1 o FOXO1 para inducir la transcripción de δ -aminolevulinato sintasa (*alas*), enzima limitante en la ruta biosintética del grupo hemo [Handschin C. *et al.*, 2005].

PGC-1 α tiene también importancia en la regulación de la mitocondriogénesis en otros tejidos, como el músculo cardiaco. La sobreproducción de PGC-1 α en cardio miocitos induce la expresión de las subunidades de los complejos respiratorios, las enzimas oxidativas, el consumo de oxígeno y la biogénesis mitocondrial. En ratón transgénico de *ppargc-1 α* la expresión mediada por un promotor cardiaco específico determina la producción masiva de mitocondrias de mayor tamaño, presencia de edema y miocardiopatía por dilatación. Sorprendentemente, la delección del gen *ppargc-1 α* no ocasiona la muerte del animal y no se observa un

decremento de la densidad mitocondrial o su morfología [Russel L.K. *et al.*, 2004]. Sin embargo se notan cambios funcionales, como la disminución del consumo de oxígeno en hepatocitos aislados, y la disminución de la expresión de ARNm que regulan algunas funciones mitocondriales.

Distintos factores nucleares tienen la capacidad de coordinar e integrar distintas funciones mitocondriales, como la β -oxidación, o promover la biogénesis mitocondrial. PPAR- α tiene efecto regulador del metabolismo oxidativo de los ácidos grasos, pero no controla eventos propios de la biogénesis mitocondrial. UCP-1 por el contrario se induce por exposición al frío (respuesta termogénica) conjuntamente a una incrementada biogénesis mitocondrial [Lowell B.B., Spiegelman B.M., 2000]. El proceso está activado por factores de transcripción que incluyen el receptor tiroideo, el del ácido retinoico y el PPAR- γ . De hecho, una vez inducida la biogénesis mitocondrial, se observa la inducción paralela de *ppargc-1 α* a la vez que se induce *err- α* [Lin J. *et al.*, 2004].

Múltiples mecanismos son responsables de estimular la biogénesis mitocondrial por PGC-1 α . Bajo condiciones normales de alimentación, los niveles hepáticos de *ppargc-1 α* son muy bajos. Sin embargo, durante el ayuno se produce un incremento de su expresión, que estimula la gluconeogénesis y la oxidación de ácidos grasos [Yoon J.C. *et al.*, 2001]. Este fenómeno es dependiente de la producción de óxido nítrico (NO \cdot) por la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), que proporciona un incremento del cGMP y es capaz de promover la expresión de *ppargc-1 α* . Ratones *knockout* de

eNOS muestran una menor cantidad de ADNmt y del consumo de oxígeno en diferentes tejidos [Nisoli E. *et al.*, 2005]. El NO[•] es también capaz de regular la expresión de *ppargc-1α* en células endoteliales [Borniquel S. *et al.*, 2006]. Sin embargo otros factores, como la fosforilación de PGC-1α por p38, son responsables de modular su efecto sobre la regulación de la biogénesis mitocondrial [Palomer X. *et al.*, 2008; Puigserver P. *et al.*, 2001].

1.3.3.b.PGC-1β

PGC-1β (o PERC) es un cofactor nuclear que pertenece a la familia de PGC-1α y tiene importantes similitudes en la secuencia de ácidos nucleicos y a nivel de proteína, tanto en el dominio de activación amino-terminal como en el carboxi-terminal. Los niveles de ARNm de *pgc-1β* en estado estacionario se parecen a los de *ppargc-1α* en distintos tejidos, como corazón, tejido adiposo marrón y músculo esquelético. De todas formas, este factor no se induce en el tejido adiposo marrón como respuesta termogénica y tiene escasa capacidad de estimular la expresión de genes gluconeogénicos en hepatocitos y en hígado [Meirhaeghe A. *et al.*, 2003]. La probable diferencia en el comportamiento de los dos factores nucleares es la falta de interacción con HNF-4α y con FOXO-1 por parte de PGC-1β. HNF-4α y FOXO-1 son responsables de la expresión de genes gluconeogénicos. Sin embargo, PGC-1β actúa como potente coactivador de NRF-1 y promueve la transcripción de genes mitocondriales reguladores de la biogénesis mitocondrial [Lin J. *et al.*, 2003].

La expresión ectópica de PGC-1 β determina un incremento del consumo de oxígeno y de la biogénesis mitocondrial, efectos parecidos a los de PGC-1 α . Sin embargo, la sobreexpresión de PGC-1 α está asociada a una mayor pérdida de protones hacia la matriz mitocondrial (*proton leak*) comparado con la sobreexpresión PGC-1 β , aunque se observe un incremento del transcrito de la *ucp-2* (proteína desacoplante 2) en ambos casos [St-Pierre J. *et al.*, 2003]. Estos hallazgos demuestran sustanciales diferencias entre PGC-1 α y PGC-1 β , aunque los dos sean promotores de la biogénesis mitocondrial a través de la interacción con NRF-1. Considerada la importancia del mantenimiento constante de los procesos de regulación de la síntesis de proteínas mitocondriales, es posible que PGC-1 β pueda compensar la ausencia de PGC-1 α en modelos animales genéticamente modificados.

1.3.3.c.PRC

PRC comparte características génicas similares con PGC-1 α en el dominio carboxi-terminal, en la región amino-terminal ácida, en la secuencia aminoacídica LXXLL que sirve como sitio de reconocimiento para receptores nucleares coactivadores y en una región enriquecida en prolina [Andersson U., Scarpulla R.C., 2001]. Confrontando la secuencia completa de ADNc de *ppargc-1 α* y *prc* se observa poca similaridad, pero la organización espacial es muy parecida. La semejanza de las funciones de PGC-1 α y PRC se observó en oncocitomas de tiroides [Savagner F. *et al.*, 2003]. De hecho, en este tipo de tumores se observó una sobrerregulación de *tfam*, *nrf-1* y

prc, asociada a una incrementada actividad de la citocromo oxidasa, un incrementado contenido de ADNmt y una mayor densidad mitocondrial, en condiciones de aparente falta de PGC-1 α . PRC tiene características de actividad parecidas a las de PGC-1 α , ya que puede utilizar NRF-1 para transactivar los genes dependientes de NRF-1 (figura 2). Además tiene la capacidad, como PGC-1 α , de transactivar los promotores de *tfb1m* y *tfb2m* [Gleyzer N. *et al*, 2005].

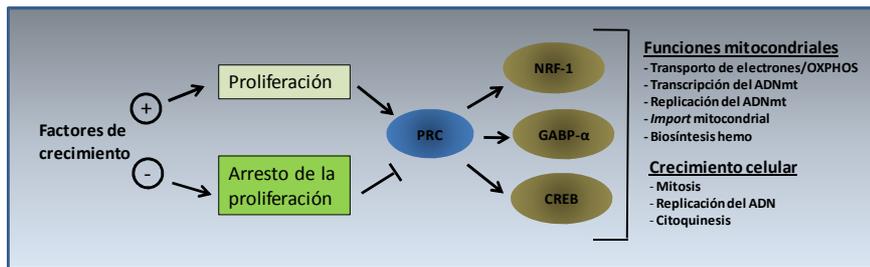


Figura 4. Biogénesis mitocondrial dependiente de PRC. PRC está sobreexpresado en respuesta a factores de crecimiento y regulado negativamente por privación de factores de crecimiento o por inhibición por contacto. PRC integra estímulos de proliferación celular con la promoción de la biogénesis mitocondrial. (Modificado de Scarpulla R.C., 2006).

Contrariamente a la semejanza de funciones entre PRC y PGC-1 α , es distinta la relevancia de estas moléculas en distintos tejidos. PRC está escasamente presente en el tejido adiposo marrón y aumenta muy poco en respuesta a un estímulo térmico (exposición a frío) [Andersson U., Scarpulla R.C., 2001]. PRC se induce rápidamente en fibroblastos quiescentes estimulados con suero, y se sobreexpresa en células en fase de crecimiento comparadas con células quiescentes. Estos cambios se observaron en ausencia de cambios de PGC-1 α , y se propuso que PRC es un coactivador regulado por

crecimiento. Los efectos de la sobreexpresión de PRC son parecidos a los observados por sobreexpresión de *ppargc-1α*: aumentada expresión de factores de transcripción mitocondriales y de las subunidades respiratorias mitocondriales y nucleares [Gleyzer N. *et al*, 2005] PRC interactúa con la proteína de unión a elementos que responden al cAMP (CREB); este último está activado en respuesta a factores de crecimiento. La interacción entre PRC y CREB puede explicar la aumentada biogénesis mitocondrial en fase proliferativa (**Figura 4**).

1.3.4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y MANTENIMIENTO DEL ADN MITOCONDRIAL

Las mitocondrias poseen un sistema genético propio, un pequeño ADN genómico circular cerrado por enlaces covalentes, de aproximadamente 16.5 kb (ADNmt). En general, en la mitocondria las moléculas de ADNmt se encuentran en asociación con proteínas formando unos complejos conocidos como nucleoides que contienen entre 2 y 10 moléculas de ADNmt [Legros F. *et al*, 2004], TFAM, mtSSB, la helicasa Twinkle y la POL- γ , además de otras proteínas todavía no identificadas [Garrido N. *et al.*, 2003]. Este genoma codifica para tan sólo 13 proteínas, que funcionan como subunidades de los complejos respiratorios I, III, IV, V. Los genes que codifican el complejo II tienen localización nuclear. El ADNmt codifica también 2 ARN ribosomales y 22 ARN de transcripción, necesarios para la traducción de transcritos de origen mitocondrial. De todas formas, los genes mitocondriales sólo son una pequeña parte de los genes

necesarios para la correcta arquitectura molecular y las funciones biológicas de la organela. De hecho, alrededor de 100 genes contribuyen a la cadena de transporte electrónico y a la fosforilación oxidativa, y más de 1000 genes se encargan del mantenimiento del orgánulo.

El genoma mitocondrial, contrariamente al genoma nuclear, presenta una elevada economía de organización de su secuencia. El *D-loop*, la única región no-codificante, es el sitio de iniciación de la transcripción de promotores divergentes, HSP (promotor de hembra pesada) y LSP (promotor de hembra ligera) [Clayton D.A., 2000]. Estos comparten un sitio de reconocimiento de TFAM y un grupo de proteínas de alta movilidad (HMG). Las HMG son un grupo de proteínas cromosómicas que ayudan en la transcripción, replicación, recombinación y reparación del ADN [Zhang Q., Wang Y., 2008]. TFAM puede facilitar la apertura del ADN y estimular la transcripción. Además, TFAM tiene un efecto estabilizante sobre el ADN mitocondrial, uniéndose a sitios libres de promotores. Ratones *knockout* de *tfam* muestran mortalidad embrionaria, confirmando el papel esencial de dicha proteína para el mantenimiento del ADN mitocondrial en mamíferos [Larsson N.G. *et al.*, 1998].

La transcripción del ADN mitocondrial en vertebrados requiere la ARN POL- γ y, por lo menos, un factor de especificidad (TFB1M o TFB2M) [Bogenhagen D.F., 1996]. TFB1M y TFB2M trabajan conjuntamente con TFAM y POL- γ para dirigir la correcta iniciación de la transcripción desde HSP y LSP. TFAM tiene la función de activar la transcripción; sin embargo, un sistema de transcripción

que incluye sólo TFAM y la ARN POL- γ no es activo. Falkenberg y colaboradores demostraron que la transcripción del ADN mitocondrial es efectiva sólo en presencia de TFB1M y/o TFB2M, siendo el segundo un orden de magnitud más activo que el primero en promover la transcripción [Falkenberg M. *et al.*, 2002].

La regulación de TFB1M y TFB2M no está totalmente clara, pero se sabe que el segundo se induce en condiciones de proliferación celular [Gleyzer N. *et al.*, 2005]. De todas formas, de la misma forma que TFAM, TFB2M es capaz de promover la síntesis de ADN mitocondrial; la sobreexpresión de TFB1M no induce incremento de las copias de ADN mitocondrial. El factor terminante de la transcripción, mTERF, está involucrado en el control del cociente entre ARNm y ARNt, por unión al sitio de terminación al final del gen 16S del ARNr ribosomal mitocondrial (*mrps16*) [Scarpulla R.C., 2008]. El evento de terminación está asociado con un sitio específico de iniciación para la transcripción de la hebra H, sugiriendo una coordinación entre terminación de la transcripción y transcripción.

El código genético utilizado por la mitocondria es algo diferente del código universal. Así, en la mitocondria humana el codon UGA codifica triptófano en lugar de ser uno de los codones de terminación, los codones AUA y AUU se utilizan, al igual que AUG, como codones de iniciación, y AGA y AGG, codones de arginina en el código universal, son señales de terminación. Los ARNm mitocondriales se traducen en el interior de las mitocondrias. Para una economía genética del ADNmt, el sistema de traducción de la

mitocondria posee ARNr más pequeños que los citosólicos o procarióticos. Por ello, otras proteínas mitocondriales sustituyen las funciones perdidas a causa de la eliminación de segmentos de ARNr. Los polipéptidos sintetizados en la mitocondria interactúan con los componentes del sistema OXPHOS (acrónimo por “fosforilación oxidativa”) codificados en el ADNn, sintetizados en ribosomas del citosol e importados a la mitocondria para producir el sistema OXPHOS. Así, la biogénesis de este sistema depende de la expresión coordinada de los genomas mitocondrial y nuclear.

1.3.5. EL SISTEMA DE IMPORT MITOCONDRIAL

La gran mayoría de las proteínas mitocondriales se sintetiza como precursor citoplasmático y se importa a la mitocondria tras su completa traducción. Por ello, un complejo sistema de *import* de membrana se encarga de: 1) facilitar la interacción de pre-proteínas citoplasmáticas con los receptores de membrana mitocondrial; 2) permitir atravesar la membrana externa mitocondrial; 3) permitir la interacción de la pre-proteína con la membrana mitocondrial interna, o como alternativa permitir su liberación en el espacio intermembranoso; 4) atravesar la membrana mitocondrial interna; 5) entrar en la matriz mitocondrial para formar parte de ella o, en caso contrario, volver a su ubicación extra-matrical (ej. membrana mitocondrial interna, espacio intercristae, etc.) (**Figura 5**).

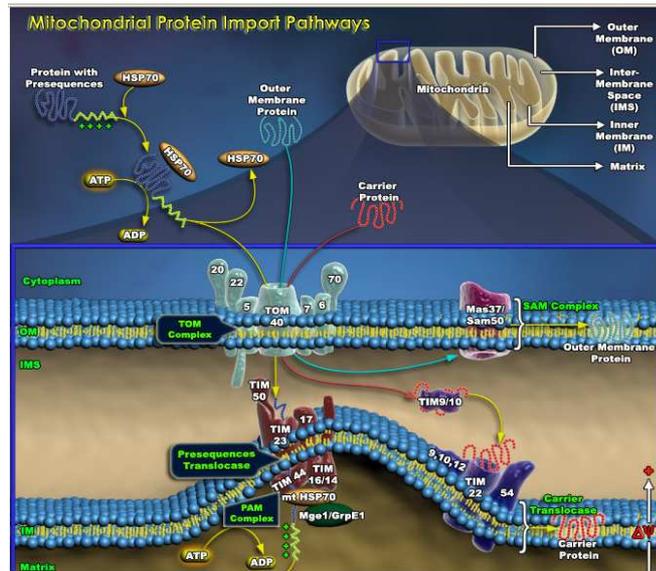


Figura 5. Sistema de *import* mitocondrial. En la figura destaca la compleja composición del sistema de *import* de proteínas mitocondriales, compuesto por las chaperonas citosólicas (en la figura se indica sólo la HSP70), las proteínas del complejo TOMM de la membrana mitocondrial externa, el complejo TIMM en la membrana mitocondrial interna, y las chaperonas mitocondriales (en la figura se indica sólo la mtHSP70).

El proceso de *import* se adapta al tipo de proteína y a la ubicación final de la misma. Es relevante mencionar que el *import* puede ser sin gasto de ATP – normalmente cuando la proteína se queda en el espacio intermembranoso –, o con gasto de ATP – cuando entra en la matriz mitocondrial [Voos W. *et al.*, 1999]. Este último, en la mayoría de los casos, requiere que se mantenga el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). Estudios de *import* mitocondrial en mitocondrias aisladas en presencia del protonóforo CCCP, muestran un deterioro de la capacidad de *import* mitocondrial de varias proteínas dirigidas a la matriz mitocondrial [Huang S. *et al.*, 2002; Singh B. *et al.*, 1990; Singh B. *et al.*, 1997; Gensler S. *et al.*, 2001].

Las sales biliares tienen especial relevancia en el contexto del *import* mitocondrial en la cirrosis hepática. Las sales biliares hidrófobas pueden causar la apertura de poros de transición de membrana (MTP) con pérdida de citocromo *c* y desencadenamiento de procesos apoptóticos [Sokol R.J. *et al.*, 2005]. Asimismo, incubando mitocondrias aisladas con diferentes sales biliares se observa una caída del $\Delta\psi_m$ [Rolo AP. *et al.*, 2000], con importante implicación sobre la producción de ATP y el *import* de proteínas mitocondriales. El UDCA, molécula utilizada para el tratamiento de la cirrosis biliar, tiene efectos beneficiosos para el funcionamiento mitocondrial, ya que es capaz de revertir la pérdida de $\Delta\psi_m$ en estudios *in vitro* [Rolo AP. *et al.*, 2000].

1.3.5.a. Transporte de pre-proteínas mitocondriales hacia la mitocondria: papel de las chaperonas citosólicas

Un sistema de chaperonas citosólicas que comprende la proteína de respuesta a choque térmico HSP70 [Sheffield W.P. *et al.*, 1990], la HSP90 [Young J.C. *et al.*, 2003], y el factor estimulante del *import* mitocondrial (MSF) [Hachiya N., *et al.*, 1994], intervienen en la *import* de pre-proteínas mitocondriales codificadas por el genoma nuclear. Las chaperonas asisten en el transporte presentando la proteína a los receptores mitocondriales en un estado reconocible, normalmente lineal. La función principal de la chaperona HSP70 es facilitar el contacto entre las pre-proteínas y el receptor de membrana TOMM20. Por el contrario, el MSF tiene mayor afinidad para el receptor TOMM70 [Voos W. *et al.*, 1999].

Las pre-proteínas mitocondriales se pueden dividir en dos principales grupos: las proteínas que contienen una presecuencia (amino-terminal o carboxi-terminal), y las que contienen una secuencia de reconocimiento interna (algunos grupos de proteína contienen ambas características). Por ello, suelen tener una secuencia señal mitocondrial (MTS) localizada en el extremo amino terminal o en la secuencia interna de la proteína.

El *import* del primer tipo de proteínas normalmente se produce por eliminación (corte) del extremo amino terminal. Actualmente, algunos estudios han podido proporcionar información concluyente sobre los puntos de corte en la proteína precursora [Omura T., 1998]. Contrariamente a secuencias específicas de *import* nuclear, las proteínas dirigidas a la mitocondria contienen distintas MTS, que modifican su distribución citosólica y mitocondrial, modulando la velocidad de *import* y de *export* [Regev-Rudzki N. *et al.*, 2008], así como determinando la localización en la mitocondria [Omura T., 1998].

1.3.5.b.El complejo de *import* de la membrana mitocondrial externa (TOMM)

El sistema de *import* de proteínas de la membrana mitocondrial externa difiere del mecanismo utilizado en la membrana mitocondrial interna. Asimismo, estudios realizados en mitocondria aisladas muestran que los dos sistemas de *import* trabajan de forma independiente [Segui-Real B. *et al.*, 1993]. El

sistema de *import* de la membrana mitocondrial externa se compone de 8 proteínas: 1) TOMM5 – transfiere las pre-proteínas de los receptores TOMM20/22 al poro de *import* general (GIP); 2) TOMM6 – forma parte del GIP; 3) TOMM7 – permite la disociación de la pre-proteína desde el GIP; 4) TOMM20 – receptor de pre-proteínas con preferencia para pre-proteínas que contienen una presecuencia; 5) TOMM22 – receptor de pre-proteínas, forma parte del GIP; 6) TOMM37 – coopera con TOMM70; 7) TOMM40 – forma el canal de *import* del GIP; 8) TOMM70 (y su homólogo TOMM72) – receptor de pre-proteínas con preferencia para pre-proteínas hidrofóbicas.

Los principales receptores de la membrana mitocondrial externa son TOMM20, TOMM22 y TOMM70. TOMM20 tiene un solo dominio transmembranoso en proximidad del extremo N-terminal; su dominio citosólico reconoce principalmente precursores con señales amino-terminales [Harkness T.A. *et al.*, 1994]. TOMM20 interactúa con las pre-proteínas a través de interacciones hidrofóbicas, pero no se excluyen interacciones electrostáticas [Brix J. *et al.*, 1997; Haucke V. *et al.*, 1995]. El receptor TOMM22 tiene características similares a TOMM20. Tiene el extremo amino-terminal expuesto al citosol, y reconoce pre-proteínas con secuencia de reconocimiento mitocondrial gracias a interacciones electrostáticas [Brix J. *et al.*, 1997]. De todas formas su función es independiente del anterior, ya que su requerimiento es imprescindible para la viabilidad celular [Hönlinger A. *et al.*, 1995]. TOMM70, que es el tercer receptor del complejo TOMM, tiene un largo dominio citosólico que interactúa preferentemente con pre-proteínas que tienen una señal de reconocimiento interna. Entre ellas

destacan las de la familia de transportadores de metabolitos de membrana [Schlossmann J. *et al.*, 1994].

TOMM40 es la proteína más importante del GIP. Es una proteína de membrana integral que forma parte de un complejo proteico de 400 kDa en mitocondrias de levadura; dicho complejo está también formado por TOMM5, TOMM6, TOMM 7 y TOMM22 [Kiebler M. *et al.*, 1990; Hill K., 1998]. TOMM5 tiene una función intermedia en el complejo GIP, y media la transferencia de la pre-proteínas unidas a TOMM20/22, al canal de translocación TOMM40. TOMM5 puede también tener la capacidad, por si misma, de reconocer proteínas con presecuencia cargada positivamente [Dietmeier K. *et al.*, 1997]. La mitocondrias deficientes en TOMM5 tienen la capacidad de unirse a pre-proteínas casi con la misma eficiencia que las mitocondrias *wild-type*, pero la eficiencia del *import* está disminuida. TOMM6 facilita el ensamblaje de TOMM22 con TOMM40, facilitando así la transferencia de proteínas hacia el poro [Dekker P.J. *et al.*, 1998]. Al contrario, TOMM7 tiene función de producir cambios estructurales en el complejo TOMM; ésto es fundamental para la inserción de proteínas de membrana, como la porina [Hönlinger A. *et al.*, 1998].

El mecanismo de translocación de las proteínas a través del poro de la membrana mitocondrial externa implica la unión de las pre-proteínas al receptor de membrana externa y su *import*. Por ello, los receptores TOMM22 y TOMM40 tienen una prolongación hacia el espacio intermembranoso (llamado dominio *trans*), que permite en todo momento el contacto con la pre-proteína, hasta que pueda ser

reconocida por el sistema de *import* de la membrana mitocondrial interna [Bolliger L. *et al.*, 1995; Rapaport D. *et al.*, 1997]. El dominio *trans* de TOMM22 tiene mayor afinidad para pre-proteínas con presecuencia amino-terminal, y no tiene afinidad para las que tienen una secuencia interna de localización mitocondrial [Moczko M. *et al.*, 1997]. Durante todo el proceso de *import*, las pre-proteínas tienen que estar en un estado competente, o sea desplegado; esto les permite alcanzar el dominio *trans* de los receptores TOMM.

1.3.5.c. El complejo de *import* de la membrana mitocondrial interna (TIMM)

Al igual que el complejo de la membrana mitocondrial externa, el sistema de *import* de la membrana mitocondrial interna está compuesto por un complejo de proteínas: TIMM8, TIMM9, TIMM10, TIMM12, TIMM13, TIMM17, TIMM22, TIMM23, TIMM54, TIMM44. El transporte a través de la membrana mitocondrial interna ocurre por una cooperación entre proteínas del complejo de *import* de la membrana mitocondrial interna, y de chaperonas mitocondriales. Las proteínas citosólicas importadas no son funcionales; por lo tanto, es necesaria su activación en la mitocondria por la acción de proteasas. Sin embargo, las proteasas mitocondriales no tienen la capacidad de mejorar o facilitar el proceso de *import* mitocondrial.

El complejo TIMM se diferencia del complejo TOMM por estar encargado de la translocación completa de proteínas hacia la matriz

mitocondrial; el complejo TOMM, al contrario, tiene la característica de reconocer las proteínas citosólicas e importar sólo péptidos relativamente cortos, como las presecuencias [Mayer A. *et al.*, 1995]. Por ello, el complejo TIMM necesita una mayor “fuerza de arrastre”, generada por el potencial de membrana. Durante la fase de *import*, las proteínas destinadas a la matriz están simultáneamente en contacto con el complejo TOMM y el complejo TIMM [Horst M. *et al.*, 1995].

Las proteínas TIMM8, TIMM9, TIMM10 y TIMM13 guían la proteínas transportadoras hidrofóbicas a través del espacio intermembranoso. TIMM12, TIMM22 y TIMM54 tienen la función de permitir la incorporación de nuevas proteínas en la membrana mitocondrial. Por lo contrario, se considera que las proteínas que están dirigidas a la matriz mitocondrial tienen que tomar contacto con las proteínas hidrofóbicas TIMM17 y TIMM23, componentes fundamentales del canal de membrana de la membrana mitocondrial interna [Dekker P.J., *et al.*, 1997]. TIMM 17 y TIMM23 cooperan con la proteína periférica de membrana TIMM44 y la chaperona mtHSP70 para el *import* de pre-proteínas [Blom J. *et al.*, 1993]; de forma específica TIMM17 y TIMM23 translocan las proteínas a través de la membrana mitocondrial interna, y TIMM44 actúa como anclaje para la chaperona mtHSP70.

1.3.5.d. Papel del potencial de membrana, ATP y GTP en el import de proteínas

Para la translocación de proteínas a través de la membrana mitocondrial se requiere energía, que puede ser de origen bioquímico - el ATP generado por las reacciones metabólicas - o electroquímico - flujo de protones a través de la membrana mitocondrial interna, que genera un potencial de membrana -. Está comprobado que el potencial de membrana es importante tanto para insertar proteínas en la membrana mitocondrial interna como para atravesar la misma [Martin J. *et al.*, 1991], mientras que el ATP es utilizado por las chaperonas citosólicas.

El potencial de membrana está generado por una diferencia de cargas a los dos lados de la membrana mitocondrial interna: negativas hacia la matriz, y positivas hacia el espacio intermembranoso. Por lo tanto el potencial de membrana ejerce un efecto “electroforético” sobre las proteínas con una presecuencia cargada positivamente [Martin J. *et al.*, 1991]. El potencial de membrana es también necesario para la dimerización de TIMM23, que se disocia durante o después de la inserción de presecuencias en la membrana [Bauer M.F. *et al.*, 1996].

Durante el proceso de *import* de proteínas se requiere la utilización de ATP. De hecho, hay gasto de ATP por las chaperonas citosólicas (ATP-dependientes), responsables de poner en contacto la pre-proteína con los receptores TOMM, y por la translocación de las pre-proteínas hacia la matriz. Procesos específicos, como atravesar la

membrana mitocondrial interna, sólo son posibles cuando hay suficiente ATP; en caso contrario, las proteínas se acumulan en el espacio intermembranoso, sin poder progresar hacia la matriz [Rassow J. *et al.*, 1991]. Sin embargo, se especula que el mayor gasto de ATP se verifica en la fase de despliegue de las proteínas, para permitir su *import*. Es el momento en que las chaperonas actúan para mantenerlas en una conformación competente para su *import*. El requerimiento energético es por lo tanto dependiente del estado anterior de la proteína, es decir, su estructura terciaria.

La energía para el *import* de proteínas mitocondriales está proporcionada también por el GTP. En un estudio se demostró que el GTP aumenta la eficiencia de *import* de las pre-proteínas mitocondriales; se piensa que el GTP es importante para el paso siguiente a la inserción de presecuencias proteicas en la membrana mitocondrial interna [Sepuri N.B. *et al.*, 1998a]. El GTP se utilizaría en un mecanismo de “empuje”, contrariamente al ATP, que estaría implicado en la fase de “arrastre” de la proteína hacia la matriz mitocondrial. No se excluye también la importancia del GTP en la traslación de proteínas, en proximidad de la mitocondria. Además, el GTP regularía la unión de los ribosomas a la mitocondria, para la siguiente traslación de ARNm que codifica para proteínas mitocondriales [Verner K., 1993; Sepuri N.B. *et al.*, 1998b].

1.3.5.e. Chaperonas mitocondriales

El sistema de chaperonas mitocondriales está compuesto principalmente por la mtHSP70, apoyada por la co-chaperona MDJ-1 (proteína del dominio DNA J 1), así como por HSP60 y su co-chaperona HSP10. La presencia de mtHSP70 en la célula es indispensable para su viabilidad [Kang P.J. *et al.*, 1990]. Su localización se sitúa en el interior de la membrana mitocondrial interna, en contacto con TIMM44, que forma parte del complejo de *import* de la membrana mitocondrial interna. La interacción es dinámica y sensible al nivel de nucleótidos de la molécula mtHSP70 [von Ahsen O. *et al.*, 1995]. La actividad de la mtHSP70 está asistida por la co-chaperona MDJ-1, que está implicada en el proceso de *refolding* de las proteínas recién importadas [Rowley N., *et al.*, 1994].

1.4. LA BIOGÉNESIS RIBOSOMAL Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR

En Biología Celular, el nucléolo es la región del núcleo donde se observa la producción y ensamblaje de los componentes ribosómicos. El nucléolo tiene aspecto casi esférico, aunque su morfología pueda variar a lo largo del ciclo celular. La mayor parte de las células, tanto animales como vegetales, tienen uno o más nucléolos, aunque existen ciertos tipos celulares que no los tienen.

El nucléolo es la región heterocromática más destacada del núcleo. Está rodeado por una capa de cromatina condensada y no tiene una membrana que lo separe del nucleoplasma. En el nucléolo se encuentra el ADN ribosomal, que se utiliza como molde para la transcripción del ARN ribosomal (ARNr). Éste último se procesa por distintas endonucleasas, para dar fragmentos de menor tamaño que se incorporarán en los nuevos ribosomas. Debido a la elevada concentración de ARNr y proteínas del nucléolo, es una estructura fácilmente detectable al microscopio óptico y electrónico. En el nucléolo se aprecian 3 distintas regiones, con organización pericircular: los centros fibrilares, los componentes fibrilares densos, y los componentes granulares.

El nucléolo se fragmenta en división (aunque puede ser visto en metafase mitótica). Tras la separación de las células hijas mediante citoquinesis, los fragmentos del nucléolo se fusionan de nuevo alrededor de las regiones organizadoras del nucléolo de los cromosomas. Por ello, la morfología nuclear y su específica función – la biogénesis ribosomal – se modifican a lo largo del ciclo celular. La síntesis de ARNr está completamente inhibida durante la mitosis, o sea cuando los nucleolos se desensamblan; al finalizarse la mitosis el nucléolo vuelve a formarse y se recupera la síntesis de ARNr [Hernández-Verdun *et al.*, 2002].

1.4.1. TRANSCRIPCIÓN DE GENES RIBOSOMALES EN EL NUCLEOLO Y SÍNTESIS DE RIBOSOMAS

Los genes ribosomales localizados en el nucléolo están organizados por grupos de parejas repetidas (*tandemly repeated clusters*). Estos genes se transcriben por la ARN polimerasa I (ARN POL-I), específica para el nucléolo. La ARN POL-I promueve la síntesis de alrededor del 50% del ARN celular [Warner J.R., 1999]. En el complejo de transcripción, además de la ARN POL-I se encuentran varios factores de transcripción, como el factor de unión *upstream* (UBF), y el complejo proteico de selectividad (SL1) - compuesto por la proteína de unión al TATA-*box* (TBP) y 3 factores de activación de la transcripción (TAF) -, los factores de iniciación de la transcripción TIF-IA y TIF-IC, y otras proteínas.

La ARN POL-I transcribe el 47S, un ARNr precursor (pre-ARNr), en el centro fibrilar, o entre el mismo y el componente fibrilar denso. A partir de ello se obtendrán moléculas maduras, de menor tamaño: el 28S, el 18S y el 5,8S. En este proceso participan pequeñas ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNP), que cortan la molécula y participan en su transporte desde el componente fibrilar denso al componente granular. Paralelamente a la síntesis de dichos ARNr se transcriben otros genes en el núcleo, también implicados en la biogénesis de ribosomas. Entre ellos se encuentran el 5S - transcrito por la ARN POL-III - y varias proteínas ribosomales (alrededor de 80) - transcritas por la ARN POL-II -. En el componente granular el 18S se une a proteínas ribosomales para formar la subunidad ribosomal 40S, y los ARNr 28S y 5,8S se unen al 5S y a otras proteínas

ribosomales para formar la subunidad 60S. Finalmente, las 2 subunidades translocan al citoplasma y se unen para formar los ribosomas maduros [Boisvert F.M. *et al.*, 2007].

1.4.2. REGULACIÓN DE LA BIOGENESIS RIBOSOMAL DURANTE EL CRECIMIENTO CELULAR: IMPLICACIÓN DE LAS MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES

La transcripción de genes ribosomales está modulada durante la proliferación celular y el ciclo celular. La síntesis de ARNr varía a lo largo del ciclo celular en células de mamífero [Grummt I., 2003]. La producción de ARNr aumenta en las células proliferativas, comparada con las células quiescentes.

Durante el crecimiento celular, la síntesis de ARNr está regulada por mecanismos específicos dependientes de la diana de la rapamicina (mTOR) y de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Durante el crecimiento celular, distintos factores de transcripción regulan la actividad de la ARN POL-I; entre ellos TIF-I es probablemente el que tiene el mayor papel [Grummt I., 2003]. Al contrario, durante el crecimiento descontrolado (como en los procesos cancerosos) se pierde el control sobre la síntesis de ARNr. En esta situación, la proteína del retinoblastoma (pRB) pierde su función inhibitoria sobre el factor de transcripción UBF y el complejo SL1 [Hannan K.M. *et al.*, 2000].

La regulación de la transcripción de genes ribosomales es algo diferente de los genes nucleares. De hecho, la producción de ARNr no está regulada a nivel de iniciación de la transcripción. Bajo estimulación de la producción de ARNr por los factores de crecimiento o por la activación de MAPK, no se detectan cambios significativos del número de complejos de transcripción unidos a genes ribosomales [Stefanovsky V.Y. *et al.*, 2006a; Stefanovsky V.Y., Moss T., 2006c].

La regulación de la síntesis de ARNr es dependiente de la velocidad de elongación [Stefanovsky V.Y., Moss T., 2006c]. Experimentos *in vivo* demuestran que la activación de la transcripción por la ARN POL-I es dependiente de la activación (fosforilación) de UBF por ERK1/2 [Stefanovsky V.Y. *et al.*, 2001] (**Figura 6**). UBF se une al ADN en forma de dímero y ello determina su conformación estructural (enrollamiento de 360°).

Una vez fosforilado por ERK1/2, UBF pierde su inhibición; el ADN se desenrolla y se activa la transcripción [Stefanovsky V.Y. *et al.*, 2006b]. Sin embargo, hay mecanismos complementarios de regulación de UBF. Entre ellos, la acetilación de los genes ribosomales por la acetiltransferasa CBP (proteína de unión a CREB) es también capaz de aumentar los niveles de transcripción [Pelletier G. *et al.*, 2000]. Debe destacarse que CBP se une a UBF en los mismos sitios de unión de ERK1/2, y la misma actividad de CBP es dependiente de la actividad de ERK [Pelletier G. *et al.*, 2000].

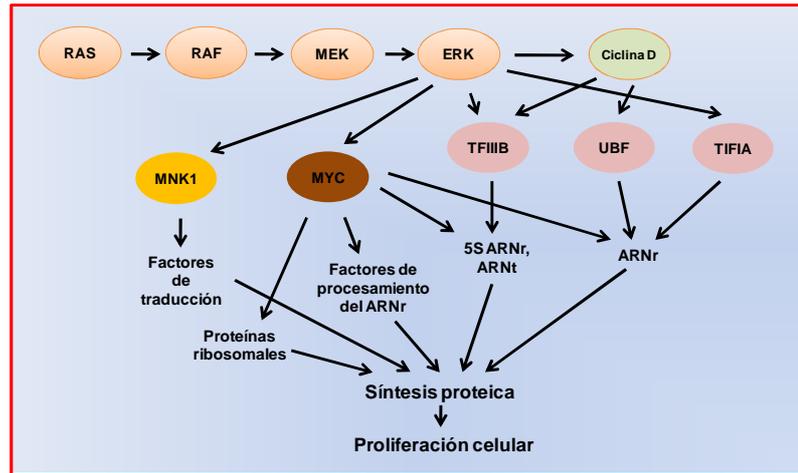


Figura 6. ERK promueve la biogénesis ribosomal a múltiples niveles. ERK1/2 es responsable de la activación c-MYC, que es un factor clave en la proliferación celular. Además promueve la síntesis proteica mediante la inducción del factor de unión a ADN UBF, y la activación de TFIIB, y TIFIA. Por lo tanto ERK1/2 promueve la síntesis proteica por múltiples mecanismos.

La síntesis de ARNr varía a lo largo del ciclo celular, siendo máxima en la fase S y G₂ [Klein J., Grummt I., 1999], y queda deprimida en fase de mitosis. Durante la fase G₁ la transcripción de ADNr aumenta moderadamente. En esta fase el complejo SL1 ha alcanzado su actividad máxima, pero la fosforilación de UBF no es todavía completa [Voit R., Grummt I., 2001]. La inactivación de la transcripción del ADNr durante la mitosis está causada por la fosforilación de SL1 y TTF-1 por parte de la quinasa dependiente de ciclina 1 (CDK-1) y la ciclina B, que reprimen la actividad del complejo de la ARN POL-I [Sirri V. *et al.*, 1999]. La actividad del complejo CDK-1/Ciclina B es suficiente para bloquear el ciclo celular en fase M; la inhibición del complejo *in vivo* determina la reiniciación de la transcripción de ARNr en células en fase de mitosis, sin

procesamiento del mismo [Sirri V. *et al.*, 2000]. UBF es inactivo en la fase de mitosis. Hasta la fecha no hay información definitiva, pero se cree que la pérdida de grupos fosfato por fosfatasas específicas puede ser clave en la regulación de su actividad [Grummt I., 2003].

Durante la interfase se observa un incremento de la actividad metabólica celular, con aumento de la velocidad de crecimiento celular. La regulación de la actividad del nucléolo es clave para mantener una cantidad suficiente de ribosomas para favorecer la síntesis proteica durante las fases de crecimiento y división.

Actualmente, se considera que modificaciones específicas post-traduccionales están encargadas de regular la actividad de las quinasas y de los factores nucleares responsables de la transcripción (y posiblemente exportación y ensamblaje) de genes ribosomales. Entre ellas la fosforilación y la SUMOilación (que es un mecanismo de regulación por la proteína SUMO) son las más relevantes. Así, el silenciamiento de la proteasa nucleolar SENP5, responsable del procesamiento de SUMO, causa defectos de división celular asociados a una aberrante morfología nuclear [Di Bacco A. *et al.*, 2006]. Hay también evidencia de que algunas fosfatasas se localizan en el núcleo o en el nucléolo según varía el ciclo celular, posiblemente para regular la actividad de específicos factores de transcripción responsables de la regulación del ciclo celular [Boisvert F.M. *et al.*, 2007].

1.4.3. REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DE GENES RIBOSOMALES EN EL HÍGADO SANO Y EN ENFERMEDADES HEPÁTICAS

Los hepatocitos se mantienen en una condición de quiescencia proliferativa, ya que se encuentran sincronizados en fase G₀. Después de un estímulo proliferativo, como la hepatectomía parcial, se observa una reentrada de los hepatocitos en el ciclo celular. Dichos cambios están asociados a un marcado incremento de la expresión de *c-fos* y *c-myc*, y pocas horas después de los genes *hsp70* y *ncl/c23* (nucleolina). Los picos de la expresión de *hsp70* y *ncl/c23* preceden el pico de formación de ribosomas (12-20 horas) y de replicación del DNA (24 horas) [Ohmori H. *et al.*, 1990].

La regulación del crecimiento/regeneración hepática está bajo el control de estímulos mitogénicos, entre los cuales se encuentran los factores de transcripción EGF (factor de crecimiento endotelial), TGF- α (factor de crecimiento transformante - alfa), y HGF (factor de crecimiento de los hepatocitos) [Fausto N., Webber E.M., 1993]. La respuesta a estos estímulos no es inmediata. Los hepatocitos necesitan reentrar en el ciclo celular (transición desde la fase G₀ a la fase G₁ del ciclo celular), fenómeno denominado *priming*. Para ello es necesario el estímulo de otros factores, como TNF- α , IL-6 y otros agentes, que pueden prevenir la hepatotoxicidad. Los ROS y el contenido de GSH actúan como moduladores de la respuesta, ya que determinan si el efecto de TNF- α sobre los hepatocitos es proliferativo o apoptótico [Fausto N., 2000].

Distintos estudios muestran que el oncogén c-MYC tiene la capacidad de transactivar los genes que controlan la proliferación celular, estimular el metabolismo de la glucosa y estimular el crecimiento independiente de anclaje en células transformadas [Cole M.D., McMahon S.B., 1999; Dang C.V. *et al.*, 1999]. Sin embargo, en fibroblastos primarios de ratón c-MYC tiene una función distinta, ya que promueve el arresto del crecimiento celular tras la inducción de p19ARF, inhibidor de MDM-2 [Eischen C.M. *et al.*, 1999]. De hecho, un interesante estudio en hepatocitos primarios muestra que la sobreexpresión de c-MYC mediante adenovirus, promueve el crecimiento de la masa nuclear y nucleolar. Estos cambios están asociados a la inducción de la biogénesis ribosomal, con incremento de la expresión de los genes ribosomales *rpl3*, *rpl6*, *rpl23*, *npm*, *ncl/c23*, entre otros. Además, el crecimiento de la masa del hepatocito no está asociado a su *priming*, que requiere por lo tanto otros estímulos. En este estudio se concluye que c-MYC es necesario y suficiente para estimular la biogénesis ribosomal y el metabolismo proteico, sin promover la proliferación celular [Kim S. *et al.*, 2000].

1.4.4. REGULACIÓN DE LA BIOGENESIS RIBOSOMAL EN LA RESPUESTA A ESTRÉS Y EN LOS PROCESOS ONCOGÉNICOS

El nucléolo, y su actividad, son sensibles a estrés. En condiciones fisiológicas, la proteína p53 tiene una vida media muy corta y está presente en la célula a niveles muy bajos. En una célula sometida a estrés exógeno (como daño al ADN, choque de calor o

hipoxia) se observa la estabilización de p53, que a su vez promueve una cascada de eventos, tales como el arresto del ciclo celular y la apoptosis. La acumulación de p53 induce la inhibición del complejo ciclina D1/CDK-4 y/o del complejo ciclina E1/CDK-2, y promueven el arresto celular en fase G1. La estabilidad de p53 está regulada por las proteínas HDM2 y p14ARF en células no transformadas humanas (en ratón la correspondientes proteínas son MDM2 y p19ARF) [Prives C., 1998]. HDM2 funciona como una ubiquitin-ligasa sobre p53; la ubiquitinación de p53 promueve su degradación en el citoplasma. Bajo estrés, se secuestra HDM2 por p14ARF en el nucléolo, y se observa la estabilización de p53. La proteína p14ARF tiene también otras funciones nucleolares; podría estar involucrada en la regulación de la biogénesis ribosomal, ya que regula (retarda) el procesamiento del ARNr ribosomal 47S-45S y 32S, probablemente gracias a la interacción con B23 [Bertwistle D. *et al.*, 2004].

Por tanto, en la respuesta a estrés se puede observar una disminución de la biogénesis ribosomal. Este fenómeno es dependiente de una regulación negativa de la síntesis de ARNr, a su vez regulada por el factor de transcripción TIF-IA [Mayer C. *et al.*, 2005]. En situación de estrés se observa una fosforilación del factor TIF-IA por la quinasa c-Jun amino-terminal-2 (JNK-2), que previene la interacción de TIF-IA con la RNA-POL-I, e inhibe la transcripción del ADNr [Mayer C., Grummt I., 2005]. Además, TIF-IA se desplaza del nucléolo al núcleo en condiciones de estrés, remarcando la implicación de TIF-IA en el control de la transcripción del ADNr [Mayer C. *et al.*, 2005].

Durante la proliferación celular se observa una regulación positiva de la función nucleolar. Los *mecanismos* de regulación dependen en parte de los mismos factores implicados en la supresión de tumores o en la génesis de tumores. Entre ellos, el oncogén viral c-MYC es necesario y suficiente para la entrada en el ciclo celular, y puede estar incrementado en distintas clases de tumores [Vita M., Henriksson M., 2006]. Este factor de transcripción incrementa directamente la actividad de la ARN POL-I uniéndose a elementos de reconocimiento del ADNr, y reclutando SL1 en el promotor del ADNr [Grandori C. *et al.*, 2005]. La oncoproteína c-MYC regula además la transcripción de varias proteínas ribosomales nucleolares necesarias para la síntesis ribosomal [Schlosser I. *et al.*, 2003] (**Figura 7**).

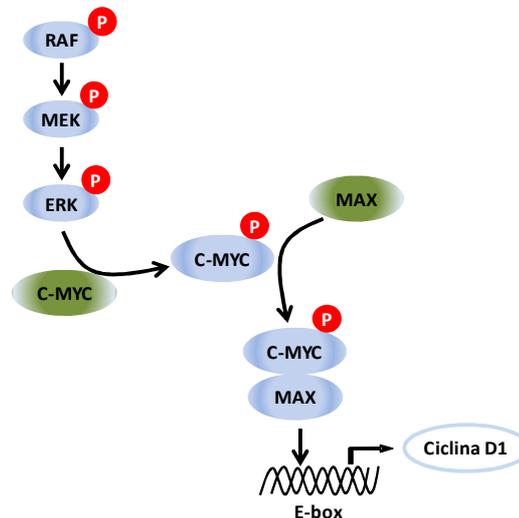


Figura 7. ERK es responsable de la activación de MYC. La activación de ERK1/2 por fosforilación promueve la activación de c-MYC. El complejo c-MYC-MAX promueve la transcripción de genes implicados en la proliferación celular (modificado de Chang F. *et al.*, 2003).

En distintas clases de tumores, el incremento de la transcripción de genes ribosomales se obtiene por fosforilación incrementada del factor UBF. Responsables son los complejos CDK-4/ciclina D1 y CDK-2/ciclina E. Este mecanismo es dependiente de la expresión incrementada de las ciclinas D y E, que controlan la progresión normal en el ciclo celular [Voit R. *et al*, 1999]. Otros cambios están asociados con las formaciones neoplásicas; los más relevantes involucran las proteínas pRB y p53. Durante el ciclo celular pRB controla el tránsito a través de la fase G₁/S, interactuando con los factores de transcripción de la familia E2F. pRB, en la forma hiperfosforilada, está unida a E2F, y previene la activación de los genes ribosomales (**Figura 8**). En caso contrario (defosforilación o degradación de pRB) E2F está disponible para la activación de dichos genes.

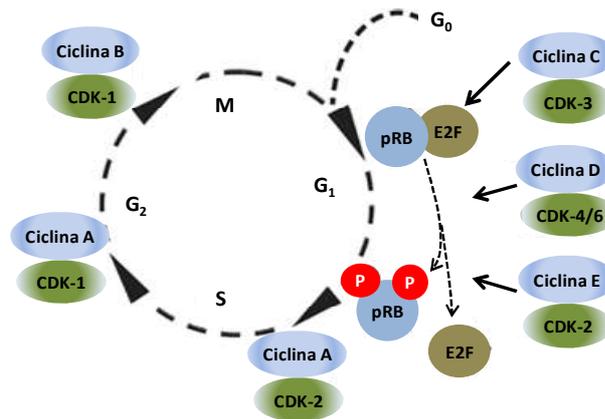


Figura 8. Regulación de la maquinaria del ciclo celular por RB. Durante la fase G₀ y el comienzo de la G₁, RB interactúa físicamente con los factores E2F y bloquea sus dominios de transactivación. Durante la fase G₁ tardía, la fosforilación de RB (p-RB) permite la liberación de E2F, que favorece la transición a la fase S. (modificado de Giacinti I., Giordano A., 2006).

OBJETIVOS

Capítulo Segundo

2.1.HIPÓTESIS DE TRABAJO

El hígado colestásico se caracteriza por importantes alteraciones morfo-funcionales que son causa de cirrosis hepática. Son característicos en esta enfermedad: a) una variación del equilibrio entre síntesis y eliminación de la matriz extracelular, que conlleva una reestructuración del parénquima hepático y el desarrollo de fibrosis, b) una alteración de la función mitocondrial, que es causa del trastorno metabólico y del estrés oxidativo, c) una importante hepatomegalia, probablemente con finalidad compensatoria frente a la necrosis hepatocitaria.

En estadios avanzados de la colestasis se observa un importante deterioro de la función mitocondrial. Es característica una mayor producción de peróxidos, asociada a una menor eficiencia de la cadena de transporte mitocondrial y una menor producción de ATP. Múltiples mecanismos pueden estar implicados en el daño mitocondrial, siendo el estrés oxidativo uno de ellos. El tratamiento con ácido ursodeoxicólico en parte revierte las alteraciones mitocondriales en la colestasis extrahepática crónica. Sin embargo, no se conoce si la biogénesis mitocondrial está funcionando correctamente. Por ello, se pretenden estudiar los mecanismos de regulación de la biogénesis mitocondrial a nivel nuclear y mitocondrial, y los mecanismos de transporte de las proteínas citosólicas hacia la mitocondria.

Otra de las características del hígado cirrótico es la hepatomegalia. Este fenómeno es relevante, ya que el crecimiento descontrolado del órgano puede ser causa de una transformación tumoral (hepatocarcinoma). Por esto, la cirrosis está considerada, por algunos autores, como patología precancerosa. En el presente trabajo se pretende estudiar en el hígado cirrótico la biogénesis ribosomal, uno de los principales mecanismos de regulación de la síntesis proteica y, por lo tanto, del crecimiento y de la proliferación celular.

2.2.OBJETIVOS

Según las hipótesis postuladas en el presente estudio, se distinguen los siguientes objetivos concretos:

1. En relación con la biogénesis mitocondrial en la cirrosis biliar:
 - a) Determinar si la pérdida de funcionalidad y densidad mitocondrial promueve la biogénesis mitocondrial a nivel nuclear en el hígado cirrótico.
 - b) Determinar si la pérdida de mitocondrias en el hígado cirrótico es dependiente de alteraciones en los mecanismos de *import* mitocondrial.

2. Respecto a la biogénesis ribosomal en la cirrosis biliar:
 - a) Estudiar los mecanismos de activación de c-MYC implicados en la regulación de la proliferación ribosomal en el hígado cirrótico.
 - b) Estudiar los mecanismos de regulación de la biogénesis ribosomal en el hígado cirrótico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo tercero

3.1. MATERIALES

3.1.1. APARATOS

- Agilent Bioanalyser 2100.
- Agitador magnético Selecta, modelo Agimatic-S.
- Agitador orbital marca Stuart modelo Rocket SSL3.
- Autoclave Selecta, modelo Autester-G.
- Balanzas de precisión SARTORIUS, modelo TECATOR 6110 y modelo PT 1200.
- Baño con termostato, provisto de agitación automática regulable, marca SBS modelo BT.
- Bomba peristáltica (BioRad).
- Maquina para cortar el pelo.
- Set de material quirúrgico: pinzas de clamp, tijeras con puntas rectas y con puntas roma, pinzas rectas y pinzas curvas, porta agujas, seda para suturas (3/0 y 5/0).
- Campana de flujo laminar vertical CULTAIR modelo B100.
- Captador de imágenes Fujifilm-LAS 300.
- Centrífuga refrigerada marca HETTICH, modelo Rotina 420R.

- Cubetas de electroforesis y electrotransferencia de BIORAD, modelo Mini-PROTEAN 3 Cell.
- Espectrofotómetro KONTRON modelo Uvikon 810 con baño termostatzado.
- Estufa termostatzada de cultivos NAPCO modelo 5415IR, CO2 System.
- Fuente de alimentación de electroforesis marca SIGMA, modelo PS 250-2, y marca BIO-RAD, modelo 200/2.0 Power Supply.
- Homogeneizador marca Heidolph, modelo RZR 2021.
- pHmetro marca CRISON, modelo Microph 2001, con un electrodo incorporado INGLOD.
- Pipetas de 1000, 200, 20, 10, 5 y 2 ml de la marca GILSON.
- Termociclador Techne modelo TC-312.
- Transiluminador de ultravioleta.
- Ultracongelador NewBrunswick modelo SC-420.

3.1.2. REACTIVOS

- Anestésias: Ketamina (Imalgene 500), Acepromicina (Calmoneosan).
- Etanol 70%, Betadine ®.
- Placas petri, tubos de plástico de 50 y 15 ml, rascadores *cell scraper* (Corning), filtros de jeringa de nylon 0,45 µm (Nalgene).

- Fosfatasa alcalina (CIAP) (Sigma Aldrich).
- Lowry Protein Assay Kit (Sigma Aldrich Química).
- MTT (Calbiochem).
- DMSO (Sigma Aldrich Química).
- Inhibidores de proteasas: *cocktail* de inhibidores de proteasas, leupeptina, bestatina, aprotinina, E64, pepstatina A y AEBSF (Sigma Aldrich Química).
- Primers: véase “Diseño de oligonucleótidos (primers)”.
- Acrilamida, TEMED, persulfato amónico (APS), dodecilsulfato sódico (SDS), DL-Ditiotreitol (DTT), albúmina de suero fetal (BSA) (Sigma-Aldrich Química), β -mercaptoetanol, dual color protein molecular marker (Biorad).
- Membranas de transferencia de nitrocelulosa 0,45 μ m (Schleicher & Schuell Bioscience).
- Anticuerpos: véase sección “Determinación de la abundancia de proteínas por *western blotting*”.
- Kit de revelado de *western blot*: Phototope™ HRP Detection kit (Cell Signaling Technology).
- Radiografías X-OMAT, líquido de revelado, líquido fijador (Kodak).
- Inhibidores de fosfatasas: fluoruro sódico, pirofosfato sódico, ortovanadato sódico (Sigma Aldrich Química).
- El resto de reactivos y material fungible se obtuvo de los siguientes laboratorios: Bromatos, Afora, Greiner Bio-one,

Sigma-Aldrich Química (España), Boehringer Mannheim S.A. (Alemania), Molecular Probes, Panreac, Merck Biochemica (Alemania), Biorad, Amersham, Poch, BRL Life Technologies (USA) y Calbiochem (Alemania).

3.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y CIRUGÍA

Para este trabajo se han utilizado ratas macho Wistar albinas de 3-4 meses de edad y de un peso entre 250-350 g, mantenidas y cuidadas en los laboratorios de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina (U.C.I.M.) de Valencia bajo condiciones de temperatura ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$), humedad relativa (60%) y ciclos de luz /oscuridad (12 /12 h) constantes. Los animales que recibieron la ligadura del ducto biliar común (BDL) y los animales que recibieron la sola laparotomía (SHAM) tuvieron libre acceso al agua y fueron alimentados *ad libitum* con pienso estándar.

Considerado que la restricción calórica está implicada en la regulación de algunos genes que controlan la biogénesis mitocondrial, para el presente estudio se tuvo en cuenta la variable “ingesta calórica”. Para ello, el diseño experimental de este estudio incluyó 3 grupos de animales: SHAM, BDL, y PAIR FED (ver en el apartado siguiente para la descripción del procedimiento quirúrgico). En general, los animales con colestasis extrahepática comieron alrededor de un 20 % menos durante todo el tiempo del

experimento, comparado con los animales SHAM. Por ello, el grupo de animales PAIR-FED fue alimentado con una cantidad de pienso correspondiente a la ingerida por las ratas BDL.

Para otra parte del estudio se utilizaron ratones C57/BL6 *knockout* del gen *ppargc1-α* ($PGC-1\alpha^{-/-}$), y ratones control (*wild type*) de la misma cepa. Los animales se mantuvieron en las mismas condiciones que las ratas (ciclo luz:oscuridad, acceso a bebida y comida). Estos animales se cuidaron en el animalario de la Facultad de Farmàcia de la Universitat de València.

3.2.1. TÉCNICA QUIRÚRGICA: LIGADURA DEL DUCTO BILIAR

Las operaciones de ligadura del ducto biliar común se realizaron con los animales bajo anestesia (ketamina, 40 mg/kg b.w., acepromazina, 12 mg/kg b.w.) (**Figura 9**). El abdomen del animal se rasuró y desinfectó (Betadine®) para mantener una condición de semi-esterilidad, necesaria para disminuir el riesgo de infecciones post-operatorias. Para tener acceso a los órganos abdominales, se realizó una incisión en el abdomen transversalmente por la línea alba; la longitud del corte fue de unos 3 cm. En el caso de observar una hemorragia en la capa muscular, se ocluyeron durante unos 45-60 segundos los vasos sanguíneos con pinza de *clamp*. Para tener un mejor acceso al ducto biliar, se colocó un tubo de ~2 cm de diámetro detrás del dorso del animal que lo obliga a arquearse.

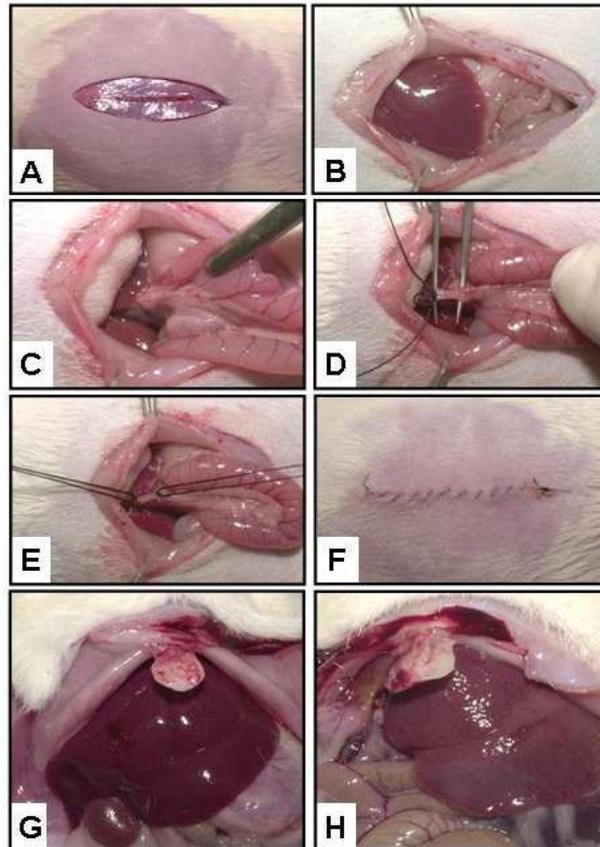


Figura 9. Técnica quirúrgica: ligadura del ducto biliar común. A) Incisión abdominal. B) Apertura de la cavidad abdominal. C) Exposición del ducto biliar común. D) Ligadura del ducto. E) Aspecto de un ducto ligado. F) Costura abdominal. G) Imagen de un hígado normal 28 días después de la operación SHAM. H) Imagen de un hígado cirrótico 28 días después de la ligadura del ducto biliar común.

Después de haber desplazado el hígado en dirección craneal con ayuda de un disector estéril, se aisló el ducto biliar por apertura de la faja que lo tiene en contacto con los vasos adyacentes. A continuación, se ocluyó el ducto biliar común con pinza de *clamp*, y se realizaron dos ligaduras dobles con seda trenzada 5/0, una arriba y una debajo del *clamp*. Terminadas las ligaduras se eliminó la pinza de

clamp, se cortó el ducto biliar entre las dos ligaduras, y se cortaron las excedencias de los hilos, procurando dejar una remanencia de unos 5-10 mm. Al acabar se quitó el tubo detrás del dorso del animal.

Se concluyó la operación quirúrgica con una sutura continua de la capa muscular y sucesivamente una sutura de la capa cutánea con dos puntos de fijación, uno en la línea mediana y el otro al finalizar la ligadura. El nudo de cierre efectuado a la altura de la línea alba sirve para dar más resistencia a la sutura. El animal fue desinfectado y puesto en una jaula limpia con una cantidad de comida pesada, para sucesivas determinaciones de la ingesta de pienso.

3.3.TÉCNICAS DE LABORATORIO

3.3.1. DETERMINACIÓN DE BILIRRUBINA TOTAL EN PLASMA

La bilirrubina es un producto de la degradación de la hemoglobina. Las células reticuloendoteliales de bazo, hígado y médula ósea convierten la hemoglobina libre en bilirrubina. Esta se puede encontrar en la sangre en forma libre o bien conjugada, unida a la albúmina.

3.3.1.a.Principio

La bilirrubina se conjuga a la sal estabilizada del diazonium. La reacción de conjugación forma azobilirrubina, que tiene absorbancia máxima a 540 nm. El reactivo utilizado tiene color claro, pálido, ligeramente amarillo. Su absorbancia a 540 nm es normalmente inferior a 0.1. Es importante proteger las muestras de la luz; la exposición del plasma a la luz durante 1 hora puede degradar la bilirrubina en un 50%. Para la medición se utilizaron los reactivos de Termo Electron Corporation.

3.3.1.b.Procedimiento

1. Poner 1 mL de reactivo en un tubo de ensayo.
2. Agregar 50 uL de la muestra, o del calibrador, o de H₂O deionizada, según el tipo de determinación.
3. Mezclar inmediatamente.
4. Incubar a la temperatura de la reacción durante 5 minutos.
5. Medir las soluciones a 540 nm.

3.3.1.c.Patrón

El calibrador es bilirrubina disuelta en agua, a pH 7,6. Dado que la reacción es lineal hasta 340 µM, la casa comercial recomienda

poner sólo un punto de calibración y utilizarlo de la siguiente manera:

$$[\text{Bilirrubina total}] (\text{mg/dL}) = (\text{Abs A} / \text{Abs B}) \times [\text{B, en mg/dL}]$$

Donde A = muestra, y B = patrón

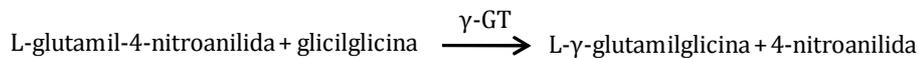
La concentración del patrón, y en consecuencia de la bilirrubina se expresa en mg/dL. Sin embargo, es posible efectuar la conversión a molaridad según la siguiente fórmula: 1 mg/dL = 17.1 μM .

3.3.1.d. Correcciones

Para eliminar posibles interferencias de absorbancia de las muestras hemolizadas o turbias, se mide la absorbancia de la muestra (50 μL) a 540 nm, diluida en 1 mL de agua deionizada. El valor obtenido se restará al valor medido en presencia del reactivo.

3.3.2. ACTIVIDAD DE LA γ -GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA

Para la detección de la actividad de la γ -GT se utilizó una modificación del método de Szasz [Szasz G., 1969].



Además de hidrolizar el glutatión, la γ -glutamyl transpeptidasa también cataliza la transferencia del grupo glutamilo de la γ -glutamyl-4-p-nitroanilida. El rango de liberación 4-p-nitroanilida es directamente proporcional a la actividad de la γ -glutamyl transpeptidasa en la muestra y se cuantifica midiendo el incremento a 405nm.

3.3.2.a.Procedimiento

1. Se prepara la solución de reacción para la γ -GT: γ -glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida 2,9 mM y glicilglicina 100 mM en tris 0,1 M a pH 8,25. Para disolverlo bien, se calienta durante 30 minutos en un baño con agua a ebullición.
2. Se mezclan 1 mL de la solución reactiva para la γ -GT y 50 μ L de cada homogenado. Cada muestra se analizó por duplicado y se realizaron dos blancos a los que se les añadió 50 μ L de agua.
3. Se incuban la muestras y los blancos a 37°C.
4. Se para la reacción a los 5 minutos de incubación por adición de ácido acético 4 N.
5. Se centrifugan las muestras 10 minutos a 3.500 *g*. Se recoge el sobrenadante.

6. Se mide la absorbancia de las muestras en macrocubetas, por espectrofotometría, a una longitud de onda de 405 nm.

3.3.2.b. Cálculos

Para calcular la concentración de 4-p-nitroanilida, se utiliza el coeficiente de extinción molar de la γ -glutamyl-4-p-nitroanilida a 405 nm ($\epsilon = 9,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), utilizando la siguiente fórmula, siendo E1 la absorbancia de la muestra y E0 la absorbancia del blanco. Se expresó la concentración de la 4-p-nitroanilida en $\mu\text{mol/mL}$.

$$[\text{4-p-nitroanilida}] = \frac{(E1-E0)}{9,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}} \times \frac{\text{vol. total (ml)}}{\text{vol. Muestra (ml)}}$$

La actividad γ -GT se determinó restando la concentración inicial de 4-p-nitroanilida a la concentración final de 4-p-nitroanilida en las muestras, y se dividió por los 5 minutos de incubación. Los valores de la actividad γ -glutamyltranspeptidasa (o tasa de formación de 4-p-nitroanilida) se expresaron en $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

3.3.3. DETERMINACIÓN DEL GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH)

3.3.3.a.Principio

Para la determinación del glutatión reducido (GSH) se utiliza un método espectrofotométrico basado en la conjugación del 1-cloro-2,4-dinitrobenzato (CDNB) con el GSH que es catalizada por la glutatión-S-transferasa. El GSH-CDNB producido absorbe luz con un máximo a 340 nm de longitud de onda. El cambio de absorbancia medido por espectrofotometría es proporcional a la cantidad de GSH presente en la muestra, con un coeficiente de extinción de $9.6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Las muestras de tejido fueron homogeneizadas en PCA 6% con EDTA 1 mM y se centrifugan a 12,000 *g* durante 15 minutos. El sobrenadante se recogió y se congeló a -80 °C para la determinación. Las determinaciones se hicieron entre los 2 primeros días después de la extracción de la muestra ácida para evitar efectos de auto-oxidación de la muestra.

3.3.3.b.Método

Para efectuar las determinaciones de la concentración de GSH se utilizó una reacción espectrofotométrica a punto final. El tampón utilizado está compuesto por: tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 7,4, EDTA 1 mM, CDBN 0,1 mM. El CDBN se prepara a una concentración

de 2 mg/mL, disuelto en etanol. A continuación, se agrega la muestra ácida según una proporción de 25 μ L cada 835 μ L de tampón.

Se efectúa la lectura del blanco y se agrega la enzima glutatión S-transferasa (12 U.I./mL). La reacción se efectúa a temperatura ambiente. Se efectúa una segunda medición a los 40 minutos del comienzo de la reacción, tiempo en el que se habrá comprobado la estabilización de la reacción en su máximo. Tras la lectura se calcula la concentración de GSH según la fórmula:

$$\text{AOD} \times \frac{V_{\text{final cubeta (0,870 mL)}}}{V_{\text{muestra cubeta (0,025 mL)}}} \times \frac{1}{9,6} \times \frac{V_{\text{PCA (mL)}} + \text{tejido (g)}}{\text{tejido (g)}} = \frac{\mu\text{mol GSH}}{\text{g tejido}}$$

3.3.4. DETECCIÓN DE FIBROSIS EN CORTES DE TEJIDO POR INMUNOHISTOQUÍMICA

Para la determinación de la fibrosis en cortes histológicos se utilizó el protocolo de Junqueira [Junqueira L.C. *et al.*, 1979].

En el momento de la extracción del hígado, se prepararon secciones de tejido de aproximadamente 1 cm³ en formalina tamponada a pH 7,4. A las 24 horas, se sustituye el tampón por otro de las mismas características. Después que la muestra ha sido fijada se elimina el fijador y se deshidrata. Debido a que una gran parte del tejido está constituida por agua, se aplica una serie gradual de soluciones de menor a mayor proporción de agente deshidratante (alcohol, desde el 50 % hasta el 100 %). No se puede colocar el tejido

directamente en 100 % etanol, ya que el agua se extraería muy rápido del tejido y se deformaría.

3.3.4.a.Aclaramiento

Luego de deshidratar el tejido, se pasa a una solución de una sustancia que es miscible tanto con el alcohol como con el medio de inclusión a utilizar (en la mayoría de los casos se utiliza como medio de inclusión parafina líquida). La sustancia comúnmente utilizada es el xilol o xilol. Se coloca la muestra de tejido en un recipiente de xilol, el xilol sólo es soluble en alcohol al 100%. Se llama aclaramiento, ya que el tejido se torna transparente o claro en el xileno, esto se debe a que cambia su índice de refracción.

3.3.4.b.Inclusión

A fin de que se puedan obtener cortes suficientemente finos para ser observados al microscopio, los tejidos tienen que ser incluidos y envueltos por una sustancia de consistencia firme (parafina). Por lo general se coloca la muestra de tejido en un recipiente y se le agrega la parafina fundida a 60° C, colocando la muestra en una estufa durante 0,5-6 horas manteniendo la temperatura a 60° C.

Debido al calor, el xilol se evapora y los espacios anteriormente ocupados por él son ahora ocupados por la parafina.

Después se coloca la pieza y un poco de parafina fundida en un molde de papel o metal de forma rectangular, y se deja solidificar a temperatura ambiente, formándose un bloque sólido de parafina con el trozo de tejido incluido, a este bloque se le denomina taco.

3.3.4.c. Sección o corte

El taco ahora se puede cortar con un microtomo en secciones lo suficientemente delgadas como para permitir el paso de la luz. La mayor parte de los preparados para microscopía óptica tienen un grosor entre 3 a 10 micrómetros.

3.3.4.d. Montaje y tinción

Los cortes todavía no son aptos para su examen con el microscopio, puesto que los tejidos se hallan infiltrados en parafina y carecen de color. Los cortes se colocan sobre un portaobjetos a los que se les ha agregado una pequeña cantidad de albúmina, la cual actúa como adhesivo.

La parafina se elimina con un solvente orgánico, de nuevo se incluyen los portas en xilol, y la muestra se rehidrata haciéndola pasar por una serie de graduaciones decrecientes de alcohol etílico hasta llegar a una solución 100% de agua.

Ya rehidratado, se tiñe el tejido. Para ello, se incuba el corte durante 2 horas a temperatura ambiente, en una solución de rojo Sirio al 1% en ácido pícrico y H₂O destilada. Se elimina el exceso de rojo Sirio con lavados en H₂O destilada. Ahora se efectúa una tinción con hematoxilina de Harris, y se vuelve a eliminar el exceso con H₂O destilada (1 lavado). Virar en agua corriente, en carbonato de litio. Efectuar una tinción rápida con eosina, durante 30-60 s. Efectuar un lavado con H₂O destilada. Finalmente, deshidratar los cortes con una serie de alcoholes de concentración creciente, de tal manera que pueda fijarse de modo permanente el cubreobjetos con un medio adecuado para el montaje.

3.3.5. HOMOGENEIZACIÓN DEL TEJIDO

Las proteínas se obtuvieron del tejido hepático por homogeneización con tampón fosfato según una proporción de 1 mL cada 100 mg. El proceso se realizó con homogeneizador mecánico y un potter Elvehjem de 2 mL con émbolo de teflón. La composición del tampón fue la siguiente (en mM): Tris-base (10), sacarosa (250), EDTA (5), cloruro sódico (50), ortovanadato sódico (0.1), fluoruro sódico (20), pirofosfato sódico (30), e Igepal 1%, a un pH de 7,4. Al tampón se le agregó un *cocktail* de inhibidores de proteasas estándar para células de mamífero, en una proporción de 5 µL por 1 mL de tampón. Tras una centrifugación del homogenado a 12000 *g* durante 20 minutos a 4 °C, se alicuotó el sobrenadante y se congeló a -80°C.

3.3.6. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS

Para el aislamiento de mitocondrias será necesario preparar la siguientes soluciones:

Solución de lavado: NaCl 0,9 %

Tampón de aislamiento de mitocondrias, cuya composición es: sacarosa 0,3 M, EGTA 1 mM, MOPS 5 mM, BSA 15 μ M, KH_2PO_4 5 mM, enrasando con H_2O . El pH del tampón se ajusta añadiendo KOH al 20 % hasta alcanzar un pH de 7,4.

3.3.6.a.Procedimiento

Una vez extraído el hígado, se introduce en una placa Petri para lavarlo con NaCl 0,9 % (el último lavado debe realizarse con tampón de aislamiento). El tejido lavado se pone sobre papel secante y a continuación se pesa. Una vez pesado se trocea y se introduce en el *potter* de vidrio, donde se añade tampón de aislamiento a razón de 2 mL/g de tejido. Tras homogeneizar a 980 rpm a 4 °C, se separa el homogenado en uno o varios tubos de centrifuga según el volumen obtenido.

A continuación procedemos al aislamiento mitocondrial propiamente dicho, que está basado en el método publicado por Rickwood [Rickwood D. *et al.*, 1991]. Este método consiste en una centrifugación diferencial que comprende dos partes principales: en

una primera parte se centrifuga el homogenado a 1000 *g* durante 10 min a 4 °C para eliminar los restos de tejido y el debris celular. A continuación, se recoge el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 3 mL de tampón de aislamiento y se vuelve a centrifugar bajo las mismas condiciones para obtener un rendimiento óptimo del proceso.

Se juntan los dos sobrenadantes obtenidos y se centrifuga de nuevo a 1000 *g* para eliminar posibles contaminaciones con restos celulares. Una vez recogido el sobrenadante, que contiene las mitocondrias, pasamos a la segunda parte del aislamiento, que comprende tres centrifugaciones a 10000 *g* durante 10 minutos a 4°C. Esta alta velocidad de centrifugación conlleva la precipitación de las mitocondrias, obteniendo por tanto un precipitado rico en mitocondrias que lavamos en centrifugaciones sucesivas. Tras la tercera centrifugación, el precipitado mitocondrial obtenido se resuspende en tampón de aislamiento, a razón de 2 µL/mg de precipitado mitocondrial. De este modo obtenemos una suspensión mitocondrial más o menos diluida en función de la determinación a realizar.

Para la determinación de masa mitocondrial hepática, se transfirió la suspensión mitocondrial a un tubo previamente pesado. A continuación, se precipitó la suspensión mitocondrial a 1000 *g* durante 10 min a 4 °C, y se volvió a pesar el tubo con el precipitado de mitocondrias. La diferencia entre el peso del tubo vacío y el del tubo con mitocondrias se aceptó como valor de masa mitocondrial. Para el cálculo de la densidad mitocondrial, se relacionó ese valor con

el peso del tejido empleado para la extracción de mitocondrias, expresado en porcentaje.

3.3.7. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEARES

Para obtener un extracto de proteínas nucleares se puede partir tanto de tejido fresco como congelado a -80°C [Deryckere F, Gannon F., 1994]. En el artículo original empiezan el protocolo con 600 mg de pulmón de rata, utilizando 3 mL de tampón A y 300 μL de tampón B.

3.3.7.a. Soluciones a preparar

Tampón A	Tampón B
<ul style="list-style-type: none"> •0,6% NP-40 (IGEPAL) •150 mM NaCl •10 mM HEPES, pH 7.9 •1 mM EDTA •3 μL de inhibidor de proteasas por cada mL de tampón (o bien 0,5 mM PMSF, 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ benzamida, 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptina, 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinina). 	<ul style="list-style-type: none"> •25 % Glicerol •420 mM NaCl •20 mM HEPES, pH 7.9 •0,2 mM EDTA •0,5 mM DTT •1,2 mM MgCl_2 •3 μL de inhibidor de proteasas por cada mL de tampon (o bien 0,5 mM PMSF, 2 mM benzamida, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptina, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinina, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pepstatina).

Pasos a seguir:

- 1- Molturar el tejido en N₂ líquido con mortero hasta conseguir un polvo. Pesar.
- 2- Resuspender el polvo en tampón A a una razón aproximada de 1 mL de tampón por cada 200 mg de peso de tejido.
- 3- Homogeneizar manulamente en homogenador de vidrio (homog. Dounce) con cinco pasadas, colocándolo en hielo.
- 4- Pasar el homogenado a tubos de 10 mL; centrifugar 1 min a 200 rpm. De este modo precipitamos el debris, sin que se arrastren los núcleos.
- 5- Pasar el sobrenadante a eppendorf®; dejar 5 min en hielo.
- 6- Centrifugar 30 s a 14000 rpm. El precipitado está constituido (principalmente) por núcleos, el sobrenadante por citoplasma.
- 7- (Guardar el citoplasma para otras determinaciones). Resuspender el precipitado en tampón B, a una razón aproximada de 50 µL por cada 100 mg de masa inicial. Dejar las muestras (de núcleos) 30 min en hielo. Cada 5 minutos agitar los eppendorf® durante 5-10 s con *vortex*.
- 8- Centrifugar 2 min a 14000 rpm.
- 9- Recoger el sobrenadante y congelarlo a -80°C. Medir la concentración de proteínas para futuras aplicaciones.

3.3.8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Para la determinación de la concentración de las proteínas totales se empleó el método descrito por Lowry O.H. [Lowry O.H. *et al.*, 1951], modificado posteriormente por Markwell M.A. [Markwell M.A. *et al.*, 1978]. La técnica descrita se basa en la formación de un compuesto coloreado que se produce cuando el reactivo de Folin-Ciocalteu interacciona con los grupos fenólicos e indólicos de los aminoácidos integrantes de las proteínas. La modificación introducida por Markwell *et al.* [Markwell M.A. *et al.*, 1978] consiste en la adición al reactivo de dodecilsulfato sódico y en el incremento de la cantidad del reactivo de tartrato-cobre. Con esta modificación, se evita la incubación de la muestra durante 12 horas en NaOH 1N. Todos los reactivos utilizados en este método están comercializados por SIGMA.

El protocolo utilizado es el siguiente. En un tubo de ensayo de 15 mL se agregaron 25 μ L de muestra a 975 μ L de agua desionizada (dH_2O). A continuación se agregó 1 mL de reactivo de Lowry a la solución, se mezcló el preparado con agitador mecánico (Vortex) y se dejó reposar en oscuridad durante 20 minutos. Posteriormente se añadieron a cada tubo 500 μ L de reactivo Folin y se volvieron a poner las muestras en oscuridad durante 30 minutos. El blanco se realizó sustituyendo los 25 μ L de muestra con el mismo volumen de dH_2O .

Finalmente, se transfirieron las soluciones a macrocubetas y se midió la absorbancia a 660 nm. La concentración de proteínas se

determinó interpolando los valores de absorbancia de las muestras a los de una curva de calibración construida con seroalbúmina bovina. La curva estándar se preparó para cada determinación.

3.3.9. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS POR WESTERN BLOTTING

3.3.9.a. Electroforesis de proteínas

La electroforesis de proteínas se hizo en geles con una matriz de poliacrilamida (PAGE, *poliacrilamide gel electroforesis*) al 12 % (29:1 acrilamida: bisacrilamida) con un 0,1 % de SDS, sobre los que se aplicó un campo eléctrico de intensidad constante de 40 mA hasta completar la electroforesis. El tampón utilizado en la cámara de transferencia fue (en mM): Tris (25), glicina (200), 0,1% SDS, pH ajustado a 8,3 con HCl. La electroforesis se hizo en condiciones desnaturizantes de las proteínas. La eliminación de la estructura nativa de las proteínas se obtiene por combinación de un detergente desnaturizante (SDS) y un agente reductor (β -mercaptoetanol).

Los complejos SDS-proteína se separan estrictamente según su tamaño molecular y, así, es posible estimar su masa molecular. En presencia de una concentración de SDS superior a 8 mM, las proteínas unen 1,4 g de SDS por gramo de proteínas, lo que equivale a la unión de una molécula de SDS por cada 2 aminoácidos. Las cargas propias de las proteínas quedan así enmascaradas o anuladas.

Debido a que cada molécula de SDS proporciona una carga negativa (del grupo SO_4^-), los complejos proteína-SDS están cargados negativamente de forma uniforme. La separación, por tanto, depende de un parámetro físico-químico - la masa molecular - que se puede calcular.

3.3.9.b. Transferencia de proteínas a una membrana

Una vez finalizado el desplazamiento electroforético, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa o bien de PVDF (polivinilidene fluoruro), mediante electrotransferencia en condiciones húmedas por medio del sistema Mini-protean II (Bio-Rad, USA). La transferencia se efectuó durante 1 hora a una temperatura de 4°C, una intensidad de corriente de 180 mA, en el siguiente tampón de transferencia (en mM): Tris (25), glicina (192), metanol 20 % v/v, pH ajustado con HCl a 8,3.

3.3.9.c. Reconocimiento de la proteína estudiada con anticuerpos específicos

Tras la transferencia, las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón de bloqueo: 5% p/v de caseína, 0,1% Tween-20 en tampón TBS (en mM): Tris (20), NaCl (137), pH 7,6. A continuación, se realizan 3 lavados de 5 minutos con 15 mL de TBS-tween (TBS-T). Posteriormente las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con agitación orbital en

tampón de anticuerpo (5% BSA disuelto en TBS-T) y con las correspondientes diluciones de anticuerpos primarios (ver **tabla 2**). Al día siguiente se realizan 3 lavados de 5 minutos con 15 mL de TBS-T. Tras el último lavado, se incubaron las membranas durante 1 hora con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano. El anticuerpo se disolvió en tampón de bloqueo (caseína 5% en TBS-T).

En la tabla siguiente se muestran las proteínas estudiadas, junto con los anticuerpos y sus diluciones (**tabla 2**).

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para el estudio.

Antígeno	Ref. anticuerpo	Empresa	Dilución anticuerpo
AMPK- α	2532	Cell Signaling	1:1000
CDK-4	Sc-23896	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Ciclina D1	Sc-20044	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Citocromo c	Sc-13156	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
ERK-1/2	9102	Cell Signaling	1:1000
Fosfo AKT (Ser437)	193H12	Cell Signaling	1:500
Fosfo AMPK- α (Thr172)	2531	Cell Signaling	1:1000
Fosfo ERK-1/2 (Thr202/Tyr204)	9101	Cell Signaling	1:1000
Fosfo p38 (Thr180/Tyr182)	9211	Cell Signaling	1:1000
Fosfo-c-MYC	Sc-101740	Santa Cruz Biotechnology	1:500
GABP- α	Sc-28311	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
HSP60	SPA-805	Stressgen	1:20.000
HSP70 / mtHSP70	SPA-757	Stressgen	1:30.000
I κ B- α	2859	Cell Signaling	1:1000

MAD-1	NB 500-136	Novus Biologicals	1:1000
NRF-1	Sc-23624	Santa Cruz Biotechnology	1:500
p21	Sc-6246	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
p38	9212	Cell Signaling	1:1000
p53	Ab-32059	Abcam	1:1000
p65 / RelA	Sc-8008	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
PCNA	Sc-56	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
PDK	Sc-28783	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
PGC-1 α	Sc-13067	Santa Cruz Biotechnology	1:200
pRB	OP28	Calbiochem	1:1000
SIRT1 (SIRT-2 en drosófila)	07-131	Upstate	1:1000
TFAM	Sc-23588	Santa Cruz Biotechnology	1:500
Tirosina fosforilada	HM5001	HyCult Biotechnology	1:500
TOMM20	Sc-11415	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
TOMM40	Sc-11414	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
TOMM70	Sc-26495	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
UBF	Sc-13125	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
VDAC1 / Porina 1	Ab15895	Abcam	1:1000
β -actina	Ab32049	Santa Cruz Biotechnology	1:1000

3.3.9.d. Captura de imagen por autorradiografía

A continuación se realizan 3 lavados de 5 minutos con 15 mL de TBS-T, y se incubó la membrana 1 minuto con reactivo ECL (Amersham Pharmacia, USA). Inmediatamente después de la incubación, se reveló la membrana por autorradiografía con películas

de fotografía (KODAK X-OMAT) o bien mediante detector de luminosidad (CANON).

Las imágenes obtenidas mediante autorradiografía fueron convertidas en formato digital, tras escaneo de las mismas. Ya en formato digital, se cuantificó por densitometría (Image Gauge) la expresión de las proteínas de las distintas bandas. El algoritmo para su determinación fue el siguiente:

$$(I_{prot.int.} - I_{ruido\ fondo}) \text{ diana} / (I_{prot.int.} - I_{ruido\ fondo}) \text{ referencia}$$

Donde $I_{prot.int.}$ = intensidad de luz de la banda diana de interés; $I_{ruido\ fondo}$ es la intensidad del ruido de fondo; “diana” y “referencia” se refieren a la proteína estudiada y a la de referencia.

3.3.9.e. Determinación de los niveles totales de p53 y de su fosforilación

La proteína p53 tiene múltiples sitios de fosforilación. La utilización de anticuerpos monoclonales específicos puede evidenciar limitaciones para la detección de los niveles totales de p53, ya que la fosforilación de p53 puede enmascarar el epitotopo reconocido por el anticuerpo.

Maya R., y Oren M. han desarrollado un método para la detección de los niveles totales de p53 [Maya R. Oren M. 2000]. La transferencia se efectúa sobre membranas de nitrocelulosa. Se incubaba la membrana con un anticuerpo que reconoce p53 y se sigue con el

protocolo normal de *western-blot*. Una vez revelado, se efectúa un stripping, se lava con TBS-tween, y se incuba la membrana durante 30 min a temperatura ambiente en un tampón donde pueda acutar la fosfatasa alcalina (0,1 M Tris-HCl, pH 8,5, y 0,2 mM EDTA, volumen final 5 mL). Se agregan a la solución 20 U/mL de fosfatasa alcalina (*calf intestinal alkaline fosfatase*, CIAP). A continuación se lava con TBS-tween, se bloquea con caseína libre de lípidos (2,5 %, w/v) durante 40 min a temperatura ambiente.

Finalmente, se incuba la membrana con el anticuerpo primario (anti-p53) durante 1 h a temperatura ambiente, y se continúa con el protocolo estándar de *western-blot*, que prevé 3 lavados de 5 min con TBS-T 0,025 % e incubación de la membrana con un anticuerpo secundario durante 1 hora. Finalmente, se realizan 3 lavados de 5 min cada uno de la membrana con TBS-T 0,025 %. Después del revelado, un incremento de los niveles de p53 indica que p53 estaba (previamente) en estado fosforilado.

3.3.10. EXTRACCIÓN DE ÁCIDO RIBONUCLÉICO (ARN)

Las extracciones de ARN se efectuaron a partir de tejido hepático utilizando el reactivo TRIZOL. Este reactivo, que es una solución monofásica de fenol y guanidina isotiocianato, ha permitido mejorar el método de extracción propuesto por Chomczynski P. y Sacchi N. [Chomczynski P., Sacchi N., 1987]. Durante la homogeneización o la lisis de las células el reactivo TRIZOL mantiene la integridad del RNA, y al mismo tiempo rompe la célula y disuelve

sus componentes. La adición de cloroformo seguida de centrifugación separa la solución en dos fases: una fase acuosa y una fase orgánica. El ARN se queda exclusivamente en la fase acuosa. Tras la transferencia de la fase acuosa a un tubo estéril, el ARN se recupera por precipitación con isopropil alcohol. Es posible utilizar la fase orgánica para análisis de ADN y proteínas (ver “extracción de ácido desossiribonucleico (ADN)”).

Esta técnica funciona bien con distintas cantidades de tejido (50-1000 mg) y células (5×10^6 - 10^7) de origen animal, vegetal o bacteriano. La relativa simplicidad de trabajo con TRIZOL permite el procesamiento de varias muestras a la vez. El ARN total aislado con este método puede llegar a estar prácticamente ausente de contaminaciones de ADN y proteínas.

La pureza del ARN aislado se valora generalmente por espectrofotometría, considerando la medida de absorbancia de los ácidos nucleicos ($A = 260$ nm) y del material proteico ($A = 280$ nm). El cociente entre los dos (A_{260}/A_{280}) se utiliza como índice de la contaminación de la muestra; valores comprendidos entre 1.8 y 2.0 indican que la muestra es de calidad adecuada.

3.3.11. ELECTROFORESIS DE ARN EN GEL DE AGAROSA

Para asegurarse de que el ARN no ha sido degradado durante la extracción, es imprescindible realizar esta técnica que nos va a permitir determinar la integridad del mismo. El fundamento se basa

en la visualización de las dos subunidades mayoritarias, que pueden ser separadas electroforéticamente y que corresponden al 28S (~5 kb) y al 18S (~2 kb) del ARNr. Deben verse dos bandas de tamaño igual a los anteriormente mencionados, claramente definidas en el gel.

3.3.11.a. Soluciones utilizadas

Tampón MOPS 10 x

Disolver 41,85 g de ácido 4-morfolino-propano-sulfónico (MOPS) y 6,80 g de acetato sódico ($\text{NaOAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, MW = 136,08) en 800 mL de H_2O -DEPC. Agitar hasta completa disolución. Agregar 20 mL de una solución de Na_2EDTA 0,5 M tratada con DEPC, y ajustar a pH 7,0 con NaOH 10 M ó ácido acético glaciado (CH_3COOH). Llevar la solución a 1 L con H_2O -DEPC.

Tampón de electroforesis

MOPS 1 x

Gel

Agarosa (D1, con baja electroendosmosis) 1 % disuelta en MOPS 1 x.

Tampón de carga 6 x

Naranja G 0,25 % (p/v), glycerol 30 % (v/v), y SDS 1,2 % (p/v), al tampón MOPS 1 x.

3.3.11.b.Procedimiento

Para la preparación del gel es necesario calentar la solución en microondas durante unos segundos (30-60), hasta que la solución empiece a hervir. Agregar bromuro de etidio a una concentración de 0,2 µL/mL. Verter la solución en la bandeja/soporte y dejar enfriar.

Una vez hecho el gel, se diluye la muestra con el tampón de carga en relación de 1:3, y se calienta a 65 °C. Se suelen cargar en el gel 0,5-1 µg de ARN. La electroforesis se realiza a 80 V durante unos 30-45 min. Terminada la electroforesis, transferir el gel al transiluminador (emite luz ultravioleta) para detectar las bandas de ARNr. Una buena calidad de ARN se caracteriza por la ausencia de *smirring*, es decir la ausencia de degradación del ARN, y la presencia de dos bandas características del ARNm. Un cociente de alrededor de 2 entre la banda de 28S y la de 18S es también una medida de la buena calidad de ARNm.

3.3.12. ELECTROFORESIS CAPILAR

La electroforesis de RNA se realizó también en un equipo (Agilent Bioanalyser 2100) que permite el tratamiento de datos en un software, mostrando el gel clásico y un electroferograma con las diferentes bandas. Al mismo tiempo cuantifica cada una de las bandas mostrando su tamaño, su concentración en ng/microlitro y molaridad. La electroforesis tiene lugar en un soporte sólido (*chip*)

que consume únicamente 1 μL de muestra. Con este equipo se evita la elaboración del gel y el tratamiento con bromuro de etidio.

3.3.13. RETROTRANSCRIPCIÓN (RT) DEL ARN A ADNc

Consiste en la obtención del ADN complementario (ADNc) a partir de un ARN mensajero (ARNm), el proceso inverso de la transcripción. Para ello son necesarias unas ADN polimerasas particulares, llamadas transcriptasas inversas o retrotranscriptasas. Las enzimas utilizadas proceden de algunos retrovirus, que son virus que presentan ARN como genoma, en vez de ADN. La retrotranscriptasa utilizada para este trabajo es la *Multiscribe* (Applied Biosystems). Para la síntesis de cDNA a partir de ARN utilizamos una mezcla de productos que incluye *random primers*, deoxinucleótidos (dNTPs), un tampón 10 x, una solución de magnesio 25 mM, inhibidor de ARNasa y dH₂O-DEPC.

3.3.14. EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL

El protocolo aquí descrito fue utilizado para la determinación de la cantidad total de ADN en tejido hepático, así como para amplificar ADN nuclear y mitocondrial. Utilizar la fase rica en fenoles y la interfase del proceso de aislamiento de RNA (protocolo de aislamiento con TRIZOL). Es conveniente eliminar toda la fase acuosa transparente.

Precipitar el DNA (4 puntos):

1. Agregar etanol 100 % en una relación de 0,3 mL cada 1 mL de TRIZOL.
2. Agitar la muestra varias veces por inversión.
3. Incubar 2-3 min a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 2000 g, 5 min, 4 °C.

Quitar el sobrenadante (contiene proteínas, fenoles y etanol) y guardar a 4°C. *El sobrenadante se puede utilizar para aislar proteínas.*

Para eliminar todos los fenoles presentes en la muestra realizar los siguientes pasos:

1. Agregar 0,1 M de citrato sódico en etanol 10 % al pellet de la centrifugación anterior. Usar 1 mL de solución cada 1 mL de TRIZOL.
2. Incubar la muestra durante 30 min a temperatura ambiente, agitando ocasionalmente.
3. Centrifugar a 2000 g durante 5 min, a 4 °C.
4. Eliminar el sobrenadante.
5. Repetir el paso 4 otras 2 veces (en total son 3 lavados).

Para precipitar el DNA (4 puntos):

1. Agregar etanol 75 % en una relación de 1,5-2 mL cada 1 mL de TRIZOL (a este punto el DNA es estable y se puede conservar durante varios meses en solución a 4 °C).
2. Incubar 10-20 min a temperatura ambiente. Agitar la muestra ocasionalmente.
3. Centrifugar a 2000 *g* durante 5 min, a 4 °C.
4. Eliminar el sobrenadante.
5. Eliminar el exceso de etanol por desecación al aire o por vacío, durante 5-10 min.

Disolver el pellet de DNA (3 pasos, el tercero es opcional):

1. Agregar NaOH 8 mM en volumen variable para que la concentración final de DNA esté en el rango de 0,2-0,3 µg/µL. La relación (aproximada) es de 0,3-0,6 mL de NaOH cada 50-70 mg de tejido o 10⁷ células.
2. Resuspender la muestra con pipeta. (Nota: el DNA obtenido de esta forma puede contener alguna sustancia gelatinosa. Para eliminarla se puede hacer el paso "c", que es opcional).

3. (opcional). Centrifugar a 12000 *g*, 10 min, 4°C. Transferir el sobrenadante (DNA) a otro tubo. El DNA obtenido se puede utilizar hasta el día siguiente (guardado a 4°C) o guardar en congelador (paso siguiente).

Para conservación de larga duración ajustar el pH a 7-8 con HEPES y ajustar la concentración de EDTA a 1 mM.

3.3.15. AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS DEL ADN GENÓMICO Y DEL ADN_c, Y DETERMINACIÓN CUANTITATIVA POR PCR A TIEMPO REAL

Una vez sintetizado el ADN_c, lo amplificamos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Éste es un método que permite amplificar de forma selectiva secuencias específicas de ADN. El método de PCR está basado en la síntesis de una hebra complementaria de ARN, utilizando una cadena simple como molde. La PCR utiliza dos fragmentos cortos de ADN (oligonucleótidos) como cebadores de la síntesis. Estos cebadores o *primers* se unen específicamente a secuencias que flanquean la región a amplificar, uno en cada una de las cadenas del ADN. El proceso básico se desarrolla en tres pasos (desnaturalización, hibridación y extensión) que se repiten sucesivas veces, según el gen a amplificar. La repetición del procedimiento un número determinado de veces produce un aumento exponencial de la cantidad de la región diana del ADN, que viene dado por la expresión 2^n (siendo n el nº de ciclos)

hasta que se llega a un punto en que disminuye la eficiencia de la enzima, y la reacción deja de ser exponencial.

La detección directa del producto de amplificación durante la fase exponencial de la reacción se realiza a través del empleo de compuestos con propiedades fluorescentes que sólo emiten fluorescencia cuando el ADN está en forma de doble cadena, de modo que determinando el incremento de fluorescencia se puede determinar la cantidad de producto formado. La sustancia fluorescente utilizada en nuestros experimentos fue SYBR Green I, el cual se une al ADN y emite fluorescencia sólo en el caso de que las dos hebras complementarias de ADN estén unidas. Este método nos permite seguir la reacción a medida que transcurre a través del incremento de fluorescencia y controlar la reacción en todo momento (aumento del nº de ciclos, repetición de ciclos, pausa, etc.).

El *software* del ordenador construye estas curvas de amplificación a partir de los datos de emisión de fluorescencia recogidos durante la reacción en tiempo real. Así, al final obtenemos una representación en la que el eje de ordenadas es la fluorescencia y el eje de abscisas es el nº de ciclos transcurridos. Una vez obtenida la representación, el eje de ordenadas se transforma en logarítmico para su mejor interpretación.

En el caso de la PCR a tiempo real, el parámetro de medida de la expresión de un determinado gen no es la fluorescencia, sino el ciclo en el que la amplificación comienza a ser exponencial. Este ciclo se denomina ciclo umbral (*threshold cycle*, Ct), pues a partir del cual

la amplificación empieza a ser realmente medible. De este modo, los valores de ciclo umbral decrecerán linealmente conforme aumenta la cantidad de ADNc de partida, puesto que cuantas más copias de ARNm de partida del gen estudiado haya, más ADNc se obtendrá en la retrotranscripción, y antes comenzará la amplificación a ser exponencial.

3.3.15.a.Procedimiento

Para la reacción de PCR a tiempo real se utilizó la Master Mix Universal con fluorocromo SYBR Green I (Applied Biosystems) y agua libre de ARNasas (dH₂O-DEPC). La reacción se llevó a cabo con una concentración de primers de 150 nM (75 nM de *forward* y la misma concentración de *reverse*) y un volumen final de 20 µL.

3.3.16. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS (PRIMERS)

Los oligonucleótidos utilizados para este trabajo se diseñaron a partir de la secuencia del correspondiente transcrito (ARNm), disponible en *Entrez Gene*, *NCBI Reference Sequences*. Una vez obtenidos los códigos de referencia, la nomenclatura estándar del gen y su localización cromosómica, se buscó la misma secuencia en Ensembl (www.ensembl.org/index.html). En este sitio web las informaciones sobre el transcrito son más detalladas, incluyendo las secuencias de exones e intrones del ADN y las regiones del ARNm que codifican a la proteína. De esta forma, se pudo extraer la

secuencia del ARNm de interés y utilizarla para conseguir la pareja de *primers* deseada. Este paso se hizo con el software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), utilizando como condiciones de elección una temperatura de *melting* entre los 59 y los 61 °C, una longitud de cada primer entre 19 y 21 bases, y una longitud del transcrito entre 50 y 100 bases.

Una vez obtenidas las posibles parejas de *primers*, se eligieron todas aquellas que respetaban uno de los siguientes criterios: 1) ambos primers cubrían los extremos de dos exones contiguos; 2) al menos uno de los *primers* cubría los extremos de dos exones contiguos; 3) los dos *primers* estaban en dos exones distintos pero tenían en el medio un intrón de tamaño superior a 1000 pb. Estos criterios permitieron elegir aquellas secuencias que amplificaban exclusivamente ARNm, no pudiendo por lo tanto amplificar las eventuales contaminaciones del ADN. En el caso de que existiera más de una pareja de secuencias posibles, se eligieron las parejas de *primers* con la menor diferencia de temperatura, y las que tenían menor probabilidad de formar *primer-dimer* y *self-annealing*.

Una vez escogidas las parejas de *primers*, se efectuó una alineación en base lógica (BLAST) frente a todas las secuencias conocidas de ADNc de rata, para averiguar la especificidad de los mismos. En aquellos casos en que los *primers* reconociesen también otros sitios en otros cromosomas se eligió otra pareja de *primers* entre las anteriormente seleccionadas, o bien se comprobaba que las secuencias de la pareja de *primers* reconociesen sitios en genes distintos.

De cada pareja de *primers* se comprobó experimentalmente la temperatura de *annealing*, haciendo un gradiente de temperaturas; las temperaturas escogidas fueron 58, 60, 62 y 64 °C. Una vez elegida la temperatura de *annealing*, se calculó la eficiencia de cada pareja de *primers*, utilizando una curva de concentraciones de ADNc. La concentración más alta de ADNc elegida fué la correspondiente a una cantidad de ARNm de 20 µg/µL. Las amplificaciones con menor cantidad de muestra se efectuaron con diluciones 1:5 de la anterior (en concreto se eligieron las siguientes concentraciones: 20, 4, 0,8, 0,16, 0,032 µg/µL de ARNm). Los cálculos de la eficiencia se efectuaron a partir de los valores de Ct. Todas las parejas de *primers* utilizadas en esta Tesis tenían eficiencias de amplificación entre 1,92 y 2,1 (los *primers* utilizados en el presente estudio se detallan en la **tabla 3**). Por lo tanto se propuso utilizar el método del delta-delta Ct, explicado a continuación.

3.3.16.a. Cálculos

En la presente Tesis realizamos una cuantificación relativa del gen problema, utilizando el método de comparación de Ct mencionado anteriormente.

La ecuación que permite la cuantificación por este método viene dada por:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\text{Donde } \Delta Ct = Ct_{\text{gen diana}} - Ct_{\text{gen referencia}}$$

Se realiza esta operación 2 veces: una para el grupo de estudio (Ct1), la otra para el grupo de control (Ct2). Luego se calcula la media y la desviación estándar de cada grupo.

Y $\Delta\Delta Ct$ = diferencia entre la media del ΔCt del grupo de estudio y el ΔCt del grupo control ($x Ct1 - x Ct2$). El método se acaba calculando la potencia en base 2 del valor negativo del $\Delta\Delta Ct$ obtenido. En el caso del grupo control se obtiene siempre un valor arbitrario de 1, ya que la potencia en base 2 de -0 es igual a 1.

En este estudio se utilizó como referencia la media de tres genes de referencia (*18s*, *gapdh*, y *rplp0*), ya que en la cirrosis biliar se observa una marcada alteración de numerosos genes, incluyendo algunos normalmente utilizados como genes de referencia. Esta problemática es común entre distintos autores [de Kok J.B. *et al.*, 2005]. En este estudio, el análisis de los Ct de los genes de referencia por separado no mostró diferencias significativa inter-grupos, pero sí una importante desviación estándar. Para ello, el cálculo de la media entre distintos genes eliminó parte de la variación intra-grupo, y estabilizó los valores medios del grupo.

Tabla 3. Primers utilizados para el estudio.

Nombre	Descripción	Referencia (Database)	Primers		Amplificación (bp)	Temperatura (°C)
			Forward	Reverse		
SONDAS PARA RNA						
<i>Alec-1</i>	angiotensin 1 converting enzyme	NM_012544.1 (NCBI)	ACCTGCTAGGGAACATGTGG	AGGGTCCACCCAGTGTATAG	20	60
<i>ATP5f1</i>	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit e (Atp5f)	NM_080481.1 (NCBI)	CGCCAAAGCGCTACAGTTAC	TTCCCTCCGCTCTATCTTCC	20	64
<i>ATP5f2</i>	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit FB	NM_053602 (NCBI)	AGTACAAGCAAGCAAGCGAATGG	CTGGGCGCAGTATCAACAGGT	20	51
<i>Col1a1</i>	Collagen 1 alpha 1	XM_213440.3 (NCBI)	CTGGTGAAAGAGGGTGTCTCT	GGAAACCTCTCTCCGCTCTT	20	72
<i>Pdg</i>	Polymerase (DNA directed), gamma	NM_053528.1 (NCBI)	CACCTTATCACCATGGGAACG	GAGCGAGCTTGAAAACACAG	20	71
<i>Tfam</i>	Transcription factor A, mitochondrial	NM_031326.1 (NCBI)	ACCAAAAGACCTGGGCTCAG	CTTCAATTCGCCCTGAGCTG	20	88
<i>Nrf1</i>	Nuclear respiratory factor 1	XM_231466.4 (NCBI)	GCACGTTGGAGAATGTGGT	GCAGACTCCAGGCTTCCAG	20	62
<i>Pparg2/a</i>	Peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha	NM_031347.1 (NCBI)	AAGGTCGCCAGGAGTAGAT	CGGTGTCTGTAGTGGCTTGA	20	69
<i>Tgfr1</i>	Transforming growth factor, beta 1	NM_021578.1 (NCBI)	TGAGTGGCTGTCTTTTGACG	ACTGAAAGGAAAGCCCTGTA	20	82
<i>Timp1</i>	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	NM_053819.1 (NCBI)	GGTCCCTGGGATAATCTGA	ATGGCTGAAAGAGGAAACAC	20	99
<i>Tuba1</i>	Tubulin, alpha 1	NM_022298.1 (NCBI)	ACCATTGCGAAAGGAGATCAT	GCTGTGAAACACCAAGAACG	20	96
<i>Cycs</i>	Cytchrome c, somatic	ENSRNCT00000014058 (Ensembl)	CAGGCTGTGGATTCCTTAC	TCCCAAGGTATACCTTTGT	21	57
<i>Guzh1</i>	Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase	ENSRNCG00000018630 (Ensembl)	ATGGGAAGCTGTCATCAAC	GATCTGCGCTCTGGAGATG	20	54
<i>Pd</i>	Fluoritin	NM_001026645.1 (NCBI)	TTTCCGATTAAGGCCAATCTGC	GATCGAAACACAGCTTCTGCG	20	58
<i>Npm1</i>	nucleophosmin 1	NM_012992.3 (NCBI)	TAGGAGATACCCAGCCAAA	ACCCTTTGACCTGGTGTGG	20	83
SONDAS PARA DNA						
<i>Tbca</i>	Tubulin colfactor A (sonda DNA nuclear)	ENSRNCG00000016100 (Ensembl)	TGTCACACCTGTTGTCTCT	GGTCTTGGACACCACTGAGG	20	50
<i>Cox1</i>	Cytochrome c oxidase subunit 1 (sonda para DNA mitocondrial)	ENSRNCG00000004234 (Ensembl)	GGGCGGATTTGGTTCG	GGGTCCGATATCTTTGTGG	20	67

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados presentados en este trabajo se expresan como media \pm desviación estándar, indicando el número de observaciones entre paréntesis. Según la distribución de los datos obtenidos (comprobación de la normalidad de distribución con prueba de Shapiro-Wilk y comprobación de la homogeneidad de las varianzas con prueba de Levene), se utilizó el tratamiento estadístico adecuado. La estadística paramétrica se efectuó aplicando el test-*t* de Student con dos colas en caso de tratar con 2 grupos o una ANOVA seguida de un test *post-hoc* (Bonferroni). Los datos que no siguieron distribuciones normales fueron tratados aplicando un test de Wilcoxon seguido (si procedía) el test *U* de Mann-Whitney para comparaciones *post-hoc*. Un α de 0,05 se utilizó como límite para la aceptación de diferencias estadísticamente significativas.

Todo el tratamiento estadístico de los resultados se realizó con hojas de cálculo de Microsoft Excel y con el software SPSS, versión 12.

RESULTADOS

Capítulo cuarto

4.1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE CIRROSIS BILIAR

4.1.1. PARÁMETROS GENERALES

La colestasis extrahepática es causa de cambios morfológicos y ultraestructurales en el hígado. A los 28 días de evolución de la colestasis, en los animales BDL se observó el característico ensanchamiento del ducto biliar común (**Figura 10**). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad de las ratas BDL a lo largo del período de estudio (SHAM = 1/5; BDL = 1/8; PAIR-FED = 0/5).

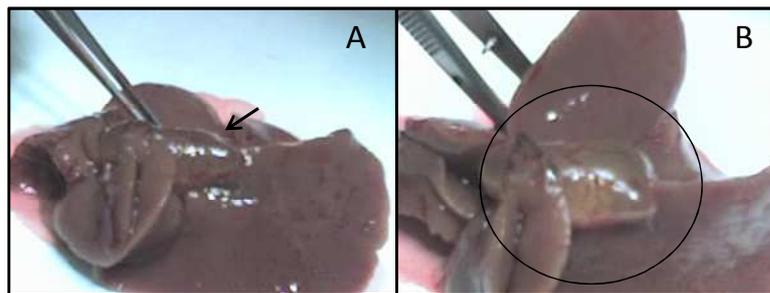


Figura 10. Características morfológicas de la colestasis extrahepática. En la imagen A se observa un hígado colestásico (flecha negra), con el ducto biliar hipertrofiado y repleto de bilis. En la figura B se aprecia el ducto biliar desde otro ángulo (marcado con un círculo).

La masa hepática incrementó un 92,3 % en comparación con el grupo SHAM, y un 94,1 % comparado con el grupo PAIR-FED tras 28 días de la cirugía. La masa de las ratas BDL no incrementó de

significativamente a los 28 días post-ligadura. Al contrario, en el grupo SHAM se observó un incremento del 7% del peso de la rata durante el período de estudio (Figura 11).

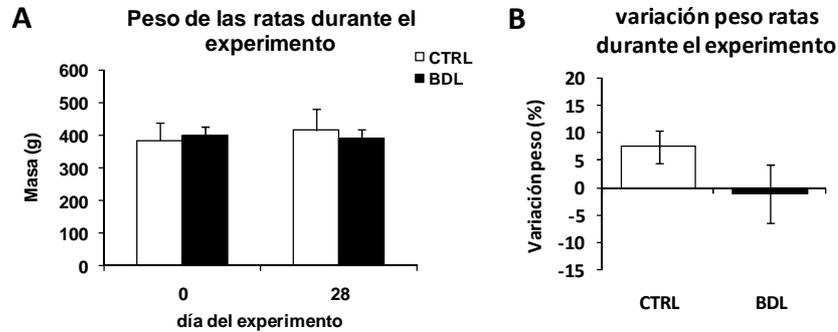


Figura 11. Variación del peso de las ratas durante la fase experimental.
 A) Peso de ratas SHAM (n=4, barra blanca) y BDL (n=4, barra negra) antes y después de la cirugía; B) Variación porcentual del peso de las ratas a lo largo del periodo experimental.

La relación entre la masa hepática y la masa corporal se utiliza para evaluar el grado de hepatomegalia, asociado a la activación de las HSC y el desarrollo de la fibrosis hepática [Iwaisako K. *et al.*, 2008]. Dicho parámetro se encontró marcadamente elevado en el grupo BDL comparado con el grupo SHAM, transcurridos 28 días desde la inducción de la colestasis (tabla 4).

Tabla 4. Características morfológicas.

	N	Masa animal		Variación del peso		Masa hepática	
		Día 0 (g)	Día 28 (g)	Absoluta (g)	Relativa (%)	Absoluta (g)	Absoluta (% p.c.)
SHAM	4	385,3±52,4	414,9±65,1	29,6±14,9	7,5±3,0	8,7±0,8	2,1±0,3
BDL	8	401,2±27,0	391,6±28,4	-9,6±30,5*	-2,2±7,2*	17,9±1,3**	4,6±0,7**
PAIR-FED	4	391,3±33,8	401,9±29,9	10,6±18,7	2,6±4,1	8,3±1,0	2,1±0,2

4.1.2. BIOQUÍMICA HEMÁTICA

El daño hepático se asocia a la variación de algunos parámetros de bioquímica hemática. La necrosis hepática está asociada a la liberación de enzimas hepáticas a la sangre. Por ello se determinó la actividad de AST y γ -GT en plasma. En las muestras de plasma del grupo BDL la actividad de la AST era doble que en el grupo SHAM. La γ -GT plasmática mostró un patrón similar, ya que su actividad era 2,5 veces mayor en el grupo BDL comparado con los grupos SHAM y PAIR-FED. Paralelamente se determinó la bilirrubina total plasmática, también considerada como marcadora para el estudio de la colestasis y la cirrosis. De hecho, la bilirrubina plasmática era ~10 veces más elevada en el grupo BDL, comparado los grupos SHAM y PAIR-FED (**tabla 5**).

Tabla 5. Bioquímica hemática.

	N	Bilirrubina (mg/dL)	AST (U/L)	GGT (U/L)
SHAM	4	0,5±0,3	110.7±23.5	0,79±0,22
BDL	8	6,3±3,3*	202.3±42.9**	4,61±1,07**
PAIR-FED	4	0,7±0,3	N.D.	0,83±0,09

La elevada desviación estándar medida en el grupo de animales cirróticos es coherente con los datos de pacientes en curso de cirrosis; efectivamente en humanos se pueden encontrar valores de bilirrubina muy elevados o sólo levemente elevados con respecto a sujetos control, independientemente de la gravedad de la enfermedad. Las alteraciones morfológicas y bioquímicas confirman

que el modelo de ligadura del ducto biliar es adecuado para el estudio de la colestasis extrahepática crónica y de la cirrosis biliar.

4.1.3. MARCADORES DE FIBROSIS HEPÁTICA

En el modelo de cirrosis biliar secundaria a colestasis extrahepática se observó una importante respuesta pro-fibrótica. El análisis histológico de los tejidos muestra una marcada alteración de la estructura hepática con formación de tabiques fibrosos, característicos de la cirrosis biliar (**Figura 12**).

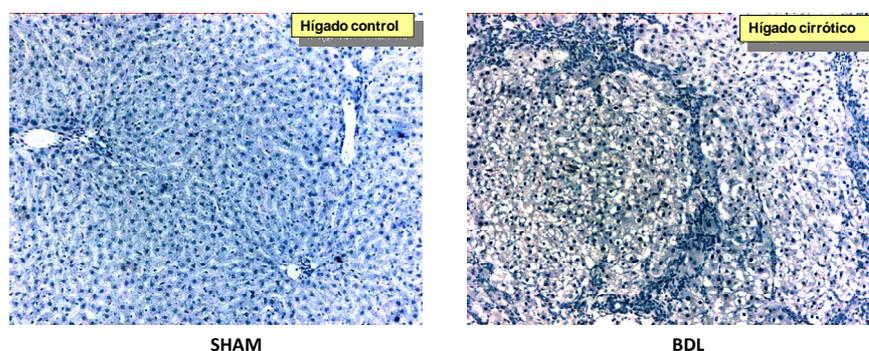


Figura 12. Inmunohistoquímica hepática para el análisis de la fibrosis.

En la imagen SHAM se observa la arquitectura hepática de un hígado sano (SHAM). En la imagen BDL se observan las características modificaciones de la arquitectura hepática con abundancia de tabiques fibrosos, tras 28 días de ligadura del ducto biliar común.

La angiotensina es uno de los principales responsables de la propagación de la señal pro-fibrótica. Su conversión es efectuada a partir de su precursor (angiotensinógeno) por efecto de la enzima convertidora de angiotensina 1 (ACE-1). En nuestro estudio se determinó la expresión de *ace-1* por PCR a tiempo real. En las

muestras de hígado BDL se observó un incremento de 12 veces en la expresión del ARNm de *ace-1* comparado con el hígado SHAM ($p < 0,01$, **Figura 13**), representativo de una importante regulación positiva de la fibrogénesis.

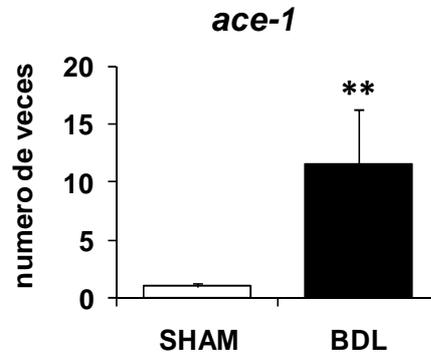


Figura 13. Expresión del gen de la enzima convertora de la angiotensina 1 en hígado. La determinación se realizó por PCR a tiempo real a partir de ARN de hígado en muestras SHAM (n=4, barra blanca), y BDL (n=7, barra negra).

** = $p < 0,01$

La activación de las HSC conlleva su transformación a células con características similares a miofibroblato, reconocibles por la síntesis de α -SMA. En este estudio se utilizó un anticuerpo anti-actina a largo espectro (Lessard J.L. Cell Motil. Cytoskel, 1988), para identificar la abundancia de actina total en muestras SHAM y BDL. En muestras BDL se observa un marcado incremento de actina total (5 veces, $p < 0,01$, **Figura 14**), que probablemente representa el incremento en α -SMA por las HSC.

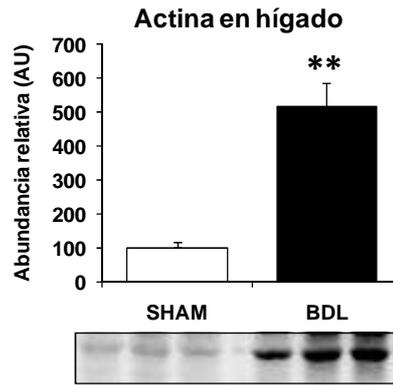


Figura 14. Actina total en hígado de rata. Determinación de la abundancia proteica de actina por *western-blot* y densitometría en hígado SHAM (n=4, barra blanca), y en hígado BDL (n=4, barra negra). Para la detección de la proteína se utilizó un anticuerpo anti-actina de amplio espectro.
** = p<0,01

La activación de las HSC y de las células de Kupffer (macrófagos hepáticos) determina el incremento de la citoquina pro-fibrótica TGF-1 β 1. En este estudio se determinó la expresión de *tgf- β 1* por RT-PCR a tiempo real. En el hígado BDL se observa un incremento de 13 veces en la expresión del ARNm de *tgf- β 1* con respecto al hígado SHAM (p<0,01, **Figura 15**).

Asimismo en el hígado BDL se observa una regulación positiva de la síntesis de ECM. En el hígado BDL la síntesis de colágeno está marcadamente aumentada, ya que la expresión del ARNm de *col-1a1* se incrementa 26 veces comparado con el hígado SHAM (p<0,01, **Figura 15**). Paralelamente, se observa una severa alteración de los mecanismos de eliminación de la ECM, estando la expresión del ARNm de *timp-1* incrementada 32 veces en el hígado BDL, con respecto al hígado SHAM (p<0,01, **Figura 15**). Estos resultados confirman el fenotipo pro-fibrótico del hígado BDL.

Expresión de genes pro-fibrogénicos

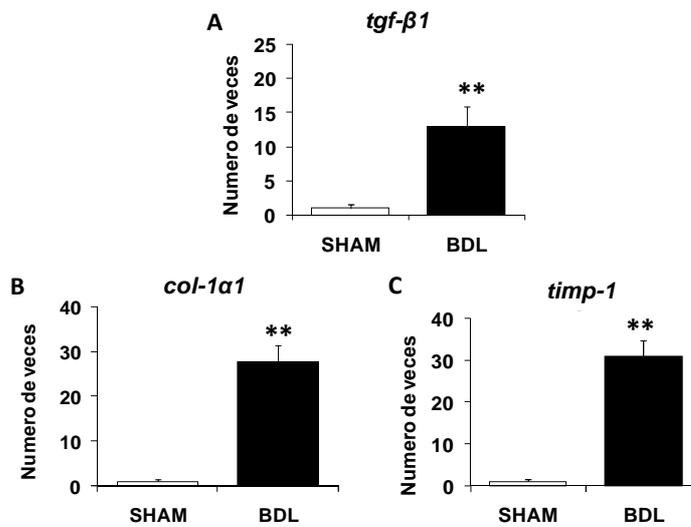


Figura 15. Expresión de genes pro-fibrogénicos en hígado. La expresión de mensajero de: A) Factor transformante $\beta 1$ (*tgf-β1*), B) Colágeno de tipo I, $\alpha 1$ (*col-1α1*), C) Inhibidor tisular de metaloproteinasas 1 (*timp-1*), se midió por PCR a tiempo real en hígado SHAM (n=4, barra blanca), y en hígado BDL (n= 7, barra negra).
** = p<0,01

En el desarrollo de la fibrosis, se observa también la activación de NF- κ B, implicado (entre otros mecanismos) en la perpetuación de las señales que promueven la síntesis de colágeno por un mecanismo de retro-alimentación positiva. Así, en las muestras de hígado BDL se observa un incremento de alrededor de 4 veces de la abundancia de RelA/p65 comparado con el hígado SHAM (Figura 16/A), junto con un incremento de la translocación de la subunidad RelA/p65 al núcleo en el hígado BDL (p<0,01, Figura 16/B). Además, en las muestras BDL se observa una marcada fosforilación de I κ B- α , que supone una pérdida de su inhibición sobre

NF- κ B (I κ B- α en estado no fosforilado impide la traslocación nuclear de NF- κ B) (**Figura 16/C**).

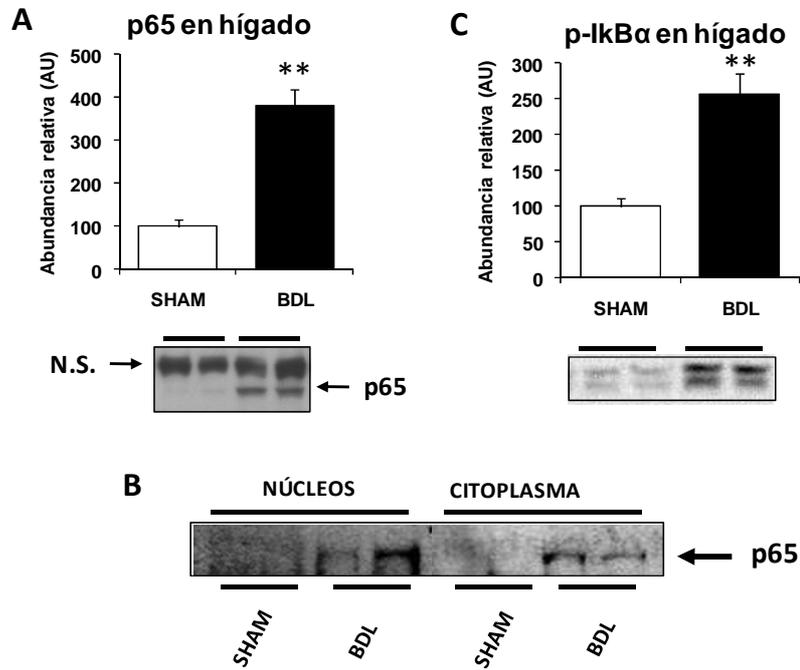


Figura 16. Activación de NF- κ B en hígado colestásico. Se determinó por *western-blot* y densitometría la abundancia proteica de: A) p65 en hígado total de rata SHAM (n=4, barra blanca) y BDL (n=4, barra negra); B) la abundancia de p65 en extractos citosólicos y nucleares; C) la fosforilación de I κ B- α en hígado SHAM y BDL.
** = p<0,01.

4.2. LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL EN LA CIRROSIS BILIAR

Uno de los principales objetivos del presente estudio era determinar la eficiencia de la biogénesis mitocondrial en ratas con colestasis extrahepática crónica. Por ello, nos propusimos determinar si las señales de regulación a nivel nuclear y mitocondrial, y los mecanismos de transporte implicados en la biogénesis mitocondrial están activos y son funcionales.

En el hígado BDL se observa una marcada disminución de la densidad mitocondrial (**Figura 17**). El peso de mitocondrias aisladas por gramo de tejido hepático (densidad mitocondrial) disminuyó un ~48 % en las ratas BDL. La disminución de la densidad mitocondrial en el grupo BDL podría estar ocasionada por una diferente eficiencia de extracción de las mitocondrias en el hígado cirrótico. Por lo tanto, como índice de biogénesis mitocondrial se determinó también el cociente entre ADNmt y ADNn.

Se aisló el ADN total, y se utilizó para determinar la abundancia de ADNmt y ADNn por PCR a tiempo real. Los cálculos se basan en un método comparativo entre los valores de amplificación del ADNmt (*cox-i/nd2*) y del ADNn (*tubulin cofactor A*) medidos en los 3 grupos. Se asumió arbitrariamente un cociente de 1 en la relación ADNmt/ADNn en el grupo SHAM. En el grupo BDL se observa una marcada disminución (-63 %) de la relación entre ADNmt/ADNn comparado con el grupo SHAM ($p < 0,01$), que confirma

la pérdida de la densidad mitocondrial observada en los experimentos de aislamiento de mitocondrias por centrifugación. En el grupo PAIR-FED, que recibió una ingesta calórica similar al grupo BDL, se observa un incremento del 35 % en la relación ADNmt/ADNn en comparación con el grupo SHAM, compatible con estudios previos de restricción calórica [Civitarese A.E. *et al.*, 2007]. Por tanto, en el hígado BDL la disminuida ingesta calórica no produce una estimulación de la síntesis de ADNmt, como se observa en el grupo PAIR-FED (**Figura 17**).

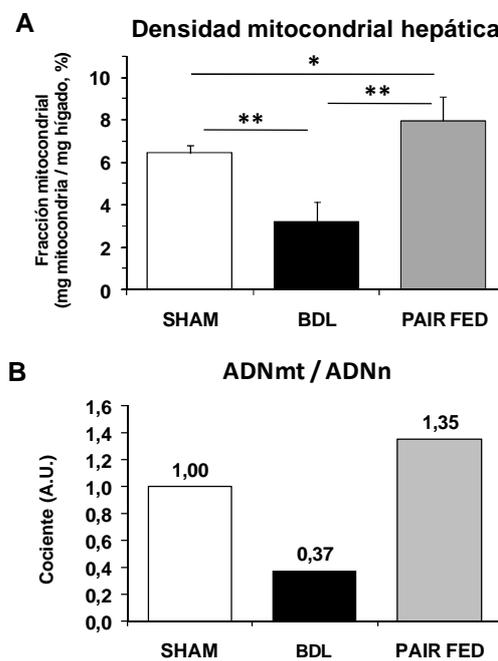


Figura 17. Densidad mitocondrial y cociente ADNmt/ADNn en hígado de rata. A) Determinación de la densidad mitocondrial hepática por centrifugación (aislamiento de mitocondrias, ver apartado “materiales y métodos”); B) Determinación del cociente entre ADNmt y ADNn en hígado BDL por PCR a tiempo real. Barra blanca: SHAM (n=4); barra negra: BDL (n=7); barra gris: BDL (n=4).
** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$.

En el hígado BDL se observa una regulación metabólica distinta respecto a los hígados PAIR-FED. La moderada restricción calórica (~20 %) en los animales PAIR-FED induce un incremento de la enzima PDK sobre los niveles de los BDL ($p < 0,01$), tal y como se observa por *western-blot* en homogenado total de hígado (**Figura 18**). En los hígados BDL no se observa dicho incremento, y la abundancia de PDK se mantiene al nivel de los hígados SHAM (**Figura 18**).

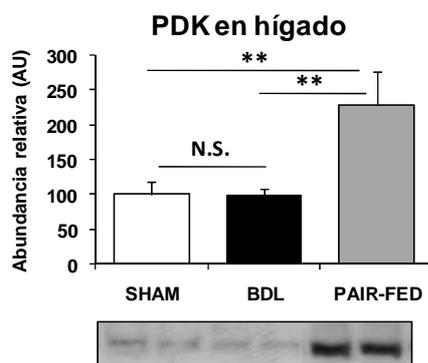


Figura 18. Abundancia proteica de PDK en hígado de rata. La figura muestra la imagen representativa de un *western-blot* y su densitometría, en hígado SHAM (n=4, barra blanca), BDL (n=4, barra negra), y PAIR-FED (n=4, barra gris).
 ** = $p < 0,01$; N.S. = diferencia no significativa.

La distinta regulación metabólica observada en el hígado BDL está además confirmada por la disminución de SIRT-1 en el grupo BDL. La moderada restricción calórica en los animales PAIR-FED induce un incremento de la enzima SIRT-1 sobre los niveles de los BDL ($p < 0,01$), tal y como se observa por *western-blot* en homogenado total de hígado (**Figura 19**). Sin embargo en los hígados BDL no se observa dicho incremento sobre los valores medidos en los hígados

SHAM (**Figura 19**). Debe destacarse que la deacetilasa SIRT-1 modula la actividad de PGC-1 α , factor transcripcional clave en la regulación de la biogénesis mitocondrial, actuando sobre su estado de acetilación.

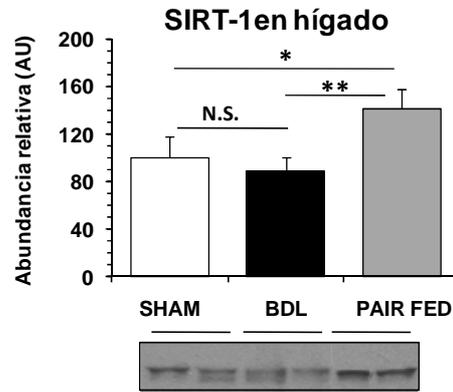


Figura 19. Abundancia proteica de SIRT-1 en hígado de rata. La figura muestra la imagen representativa de un *western-blot* y su densitometría, en hígado SHAM (n=4, barra blanca), BDL (n=4, barra negra), y PAIR-FED (n=4, barra gris).

** = p<0,01; * = p<0,05; N.S. = diferencia no significativa.

A nivel nuclear, en los hígados BDL se observa una distinta regulación de la expresión de los genes implicados en la biogénesis mitocondrial, en comparación con el grupo SHAM y PAIR-FED. La expresión de *ppargc-1 α* , importante coactivador de NRF-1, está marcadamente disminuida en el hígado BDL comparada con el hígado PAIR-FED (p<0,01) (**Figura 20/A**). En la restricción calórica moderada (grupo PAIR-FED) observamos una expresión de *ppargc-1 α* de 3,2 veces la observada en el grupo SHAM; sin embargo, en el grupo BDL la expresión de *ppargc-1 α* era tan sólo 1,4 veces comparado con el grupo SHAM (p<0,05) (**Figura 20/A**).

En los experimentos de qPCR se observan algunos cambios en la expresión de *nrf-1* y *gabp-α*. En los hígados BDL se observa un incremento del ARNm de *nrf-1* comparado con los hígados PAIR-FED ($p < 0,01$) y con los hígados SHAM ($p < 0,05$) (**Figura 20/B**). Similarmente, el ARNm de *gabp-α* está incrementado en el hígado BDL comparado con el hígado PAIR-FED ($p < 0,05$), pero no está aumentado comparado con el hígado SHAM (**Figura 20/C**).

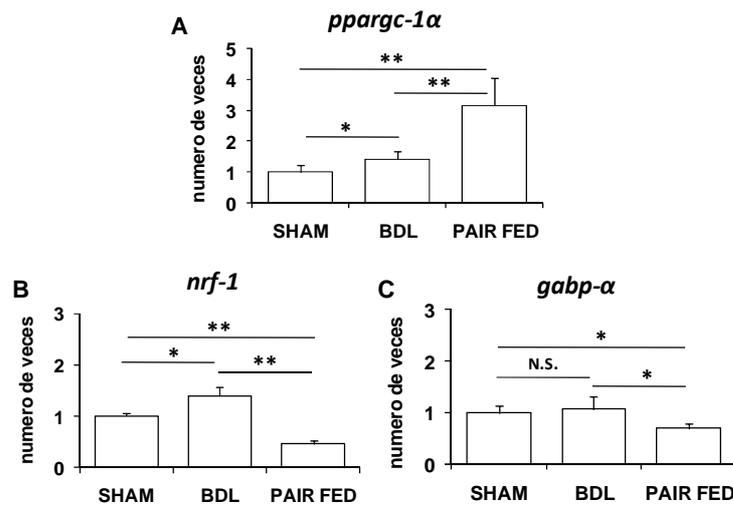


Figura 20. Expresión de genes reguladores de la biogénesis mitocondrial. Niveles de ARNm de: A) *ppargc-1α*, B) *nrf-1*, C) *gabp-α* en hígado SHAM (n=4), BDL (n=7), y PAIR-FED (n=4). La determinación se realizó por PRC a tiempo real.

** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; N.S. = diferencia no significativa.

Considerando que la eficacia de la inducción de la biogénesis mitocondrial es dependiente de la capacidad de transactivación de GABP- α , NRF-1 y el coactivador PGC-1 α , se determinó la abundancia de estas proteínas por *western-blot* en homogenado total de hígado. En el hígado BDL se observa una marcada disminución de PGC-1 α comparado con el hígado PAIR-FED ($p < 0,01$), y con el hígado SHAM ($p < 0,05$) (**Figura 21**).

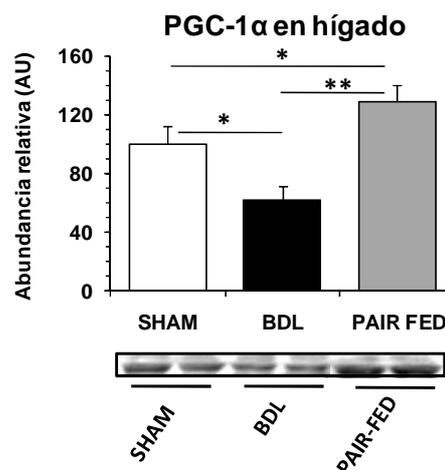


Figura 21. Nivel de proteína de PGC-1 α en hígado de rata. La figura muestra la imagen representativa de un *western-blot* y su densitometría, en hígado SHAM (n=4, barra blanca), BDL (n=4, barra negra), y PAIR-FED (n=4, barra gris).
** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$.

GABP- α , conjuntamente con NRF-1 y PGC-1 α , está implicado en la regulación de la transcripción de *tfam* [Wu Z. *et al.*, 1999]. GABP- α también está marcadamente disminuido en el hígado BDL comparado con los hígados SHAM y PAIR-FED ($p < 0,01$) (**Figura 22**).

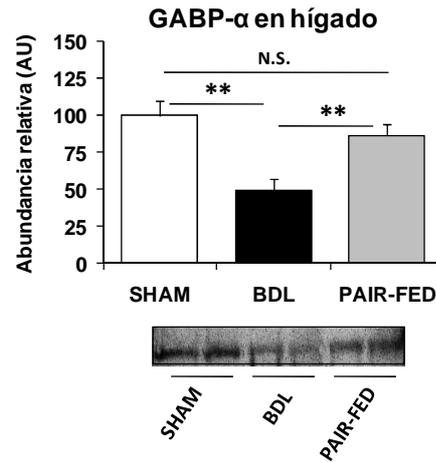


Figura 22. Abundancia proteica de GABP- α en hígado de rata. La figura muestra la imagen representativa de un *western-blot* y su densitometría, en hígado SHAM (n=4, barra blanca), BDL (n=4, barra negra), y PAIR-FED (n=4, barra gris).

** = $p < 0,01$; N.S. = diferencia no significativa.

NRF-1 es un importante regulador de la transcripción de genes de proteínas mitocondriales codificadas a nivel nuclear, además de estar implicado en la transactivación de *tfam*. La forma no fosforilada de NRF-1 disminuye marcadamente en el hígado BDL comparado con el hígado PAIR-FED ($p < 0,01$) (**Figura 23/A**), pero su forma fosforilada aumenta marcadamente ($p > 0,05$) (**Figura 23/B**). Por tanto, prácticamente todo el NRF-1 está fosforilado en el hígado BDL. Las diferencias en la expresión de NRF-1 fosforilado y no fosforilado entre el hígado BDL y el hígado SHAM son similares a la observada al comparar con el hígado PAIR-FED.

El gen *nrf-1* codifica 2 isoformas de la proteína con tamaños diferentes, pero los estudios realizados en tejido hepático muestran una única isoforma [Spelbrink J.N., Van den Bogert C., 1995]. Los

anticuerpos utilizados en este estudio para detectar NRF-1 han permitido reconocer un doblete proteico (**Figura 23/A-B**). Se considera que el doblete representa una modificación post-traducciona de la isoforma de 68 kDa de NRF-1. Dicha modificación se observa en menor grado en el hígado SHAM, y apenas es observable en el hígado PAIR-FED (**Figura 23/A-B**). La movilidad electroforética disminuida de la proteína es compatible con la fosforilación de NRF-1, tal y como se observa en otros estudios [Wang C. *et al.*, 2006]. La relación entre la forma aparentemente fosforilada y la forma nativa (fosfo-NRF-1/NRF-1) se incrementa 12 veces en el grupo BDL frente al grupo SHAM, y aproximadamente 25 veces frente al grupo PAIR-FED (**Figura 23/C**).

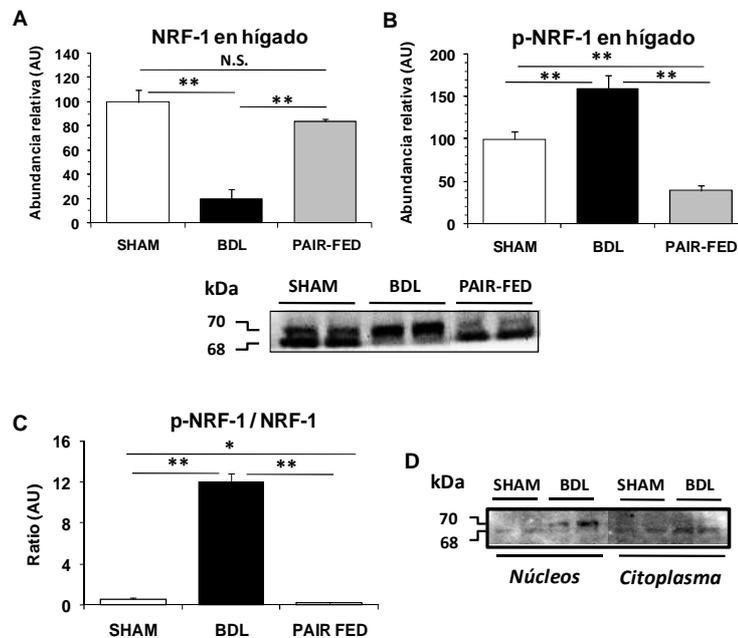


Figura 23. Estudio de la fosforilación de NRF-1 en hígado. Se muestra la imagen representativa de un *western-blot* en la que aparecen 2 bandas de distinto peso molecular, en hígado de ratas SHAM, BDL, PAIR-FED. A)

Densitometría de la banda de 68 kDa (α -NRF-1); B) Densitometría de la forma de mayor peso molecular de NRF-1 (p-NRF-1); C) Cociente entre la densitometría de la forma fosforilada de NRF-1 y la forma no-fosforilada (p-NRF-1/NRF-1); D) *Western-blot* de NRF-1 en extractos citoplasmáticos y extractos nucleares en hígado SHAM y BDL.

** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; N.S. = diferencia no significativa.

Para confirmar la fosforilación y posible activación de NRF-1 se prepararon extractos nucleares y citoplasmáticos de hígados BDL y SHAM, y se analizaron por *western-blot*. La banda de menor movilidad electroforética estaba presente sólo en los extractos nucleares de hígados BDL, estando la de mayor movilidad presente en los extractos de ambos grupos (**Figura 23/D**). Por tanto, se considera que la proteína de mayor tamaño es la forma fosforilada y la de menor tamaño la forma nativa.

La actividad de NRF-1 depende de su estado de fosforilación. Se han descrito distintos mecanismos de fosforilación de NRF-1 [Wang C. *et al.*, 2006; Suliman H.B. *et al.*, 2003]. El estrés oxidativo induce la fosforilación de NRF-1 por la quinasa AKT fosforilada en la serina 473 (Ser473) [Suliman H.B. *et al.*, 2003]. En el presente estudio fosfo-AKT(Ser473) está disminuida en el hígado BDL comparado con el hígado PAIR-FED ($p < 0,01$) y el hígado SHAM ($p < 0,01$) (**Figura 24**). Por lo tanto, no se considera que este mecanismo sea responsable de la fosforilación de NRF-1.

Otro mecanismo de fosforilación es dependiente del estrés energético, que se refleja en la activación de la quinasa AMPK. Una mayor fosforilación de AMPK puede inducir la fosforilación de NRF-1, y aumentar su unión al ADN [Bergeron R. *et al.*, 2001]. En nuestro estudio, se evidencia una disminución de la forma no fosforilada de

AMPK en hígado BDL, comparado con el hígado SHAM y PAIR-FED ($p < 0,001$) (**Figura 25/A**). Sin embargo, la forma fosforilada de AMPK es más abundante en el hígado SHAM que en el hígado BDL ($p < 0,01$), y no se observan diferencias significativas entre el hígado BDL y el hígado PAIR-FED ($p > 0,05$) (**Figura 25/B**).

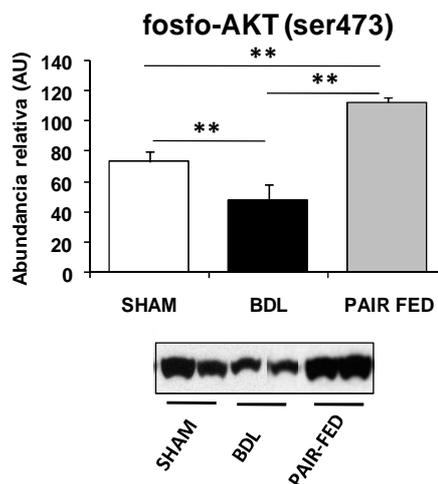


Figura 24. Abundancia proteica de la forma fosforilada de AKT (ser473) en hígado de rata. La figura muestra la imagen representativa de un *western-blot* y su densitometría, en hígado SHAM ($n=4$, barra blanca), BDL ($n=4$, barra negra), y PAIR-FED ($n=4$, barra gris).
** = $p < 0,01$.

Otro mecanismo de regulación de la actividad transcripcional de NRF-1 es dependiente de su fosforilación por el complejo ciclina D / CDK-4. Esta fosforilación disminuye su capacidad de transactivar el promotor de *tfam* [Wang C. *et al.*, 2006]. En los hígados BDL se observa una abundancia relativa de la ciclina D1 comparable con la de los hígados SHAM y PAIR FED ($p > 0,05$, **Figura 26/A**). Sin embargo, la CDK-4 está marcadamente aumentada en el hígado BDL comparado con el hígado SHAM y PAIR-FED ($p < 0,01$, **Figura 26/B**).

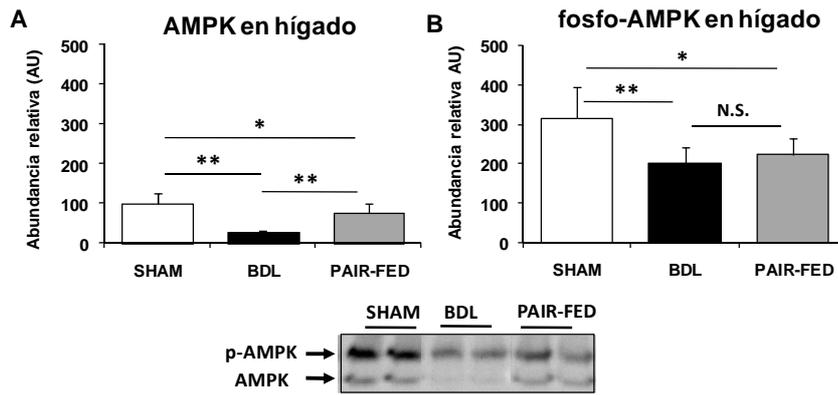


Figura 25. Estudio de la fosforilación de AMPK en hígado de rata. La figura muestra la imagen representativa de un *western-blot* y su densitometría. En el panel A) se observa la densitometría de la forma no fosforilada de AMPK en hígado. En el panel B) se muestra la forma fosforilada AMPK (p-AMPK).

** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; N.S. = diferencia no significativa.

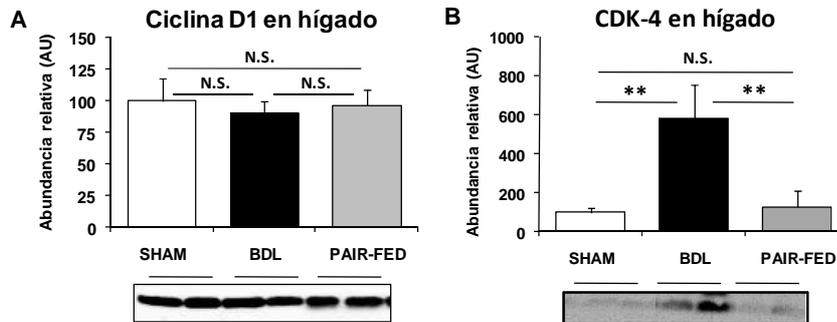


Figura 26. Nivel de proteína de la ciclina D1 y la CDK-4. En los paneles A y B se muestran los *western-blot* representativos de dos proteínas responsables de la progresión desde la fase G₁ a la fase S del ciclo celular, e implicadas en la fosforilación de NRF-1. A) *western-blot* representativo y densitometría de la ciclina D1 en hígado de rata SHAM (n=4, barra blanca), BDL (n=4, barra negra) y PAIR-FED (n=4, barra gris). B) *Western-blot* representativo y densitometría de CDK-4 en hígado de rata SHAM (n=4, barra blanca), BDL (n=4, barra negra) y PAIR-FED (n=4, barra gris).

** = $p < 0,01$; N.S. = diferencia no significativa.

El genoma nuclear codifica el 99% de las proteínas mitocondriales. Ente ellas, algunas están implicadas en la transcripción del ADNmt (*tfam* y *pol-γ*) y la fosforilación oxidativa (*atp5i*, *atp5b* y *cycs*). La expresión del ARNm de *tfam* no varía comparada con el grupo PAIR-FED. Sin embargo, la expresión génica de *tfam* está ligeramente disminuida comparada con el grupo SHAM ($p < 0,05$) (**Figura 27/A**). Similarmente, la expresión de *pol-γ* no varía en el hígado BDL comparada con el hígado PAIR-FED ($p > 0,05$), pero disminuye comparado con el hígado SHAM ($p < 0,01$) (**Figura 27/C**).

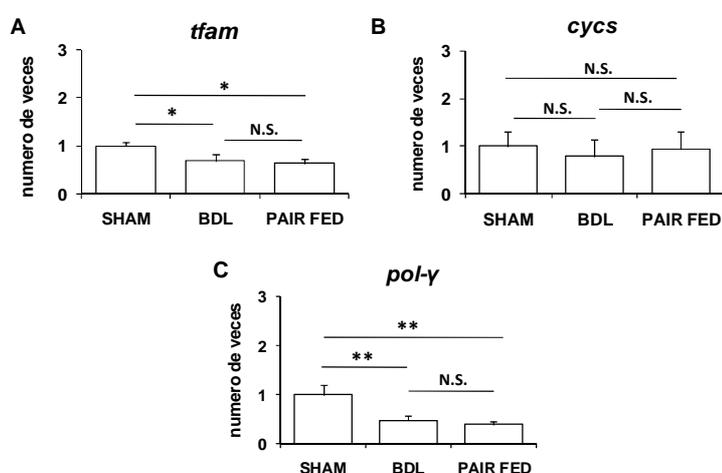


Figura 27. Expresión de genes diana de NRF-1, GABP- α y PGC-1 α , implicados en la biogénesis mitocondrial. Niveles del mensajero de: A) *tfam*, B) *cyc*; C) *pol-γ* en hígado SHAM (n=4), BDL (n=7), y PAIR-FED (n=4). La determinación se realizó por PRC cuantitativa.

* = $p < 0,05$; N.S. = diferencia no significativa.

La expresión génica de *atp5i* no varía en el hígado BDL comparado con el hígado PAIR-FED; sin embargo, se observa decremento de su expresión comparado con el hígado SHAM ($p < 0,01$) (**Figura 28/A**). En los 3 grupos experimentales no se

verifica ninguna variación en la expresión génica de *atp5b* (Figura 28/B). Lo mismo ocurre en la expresión génica de *cycs* (Figura 27/B).

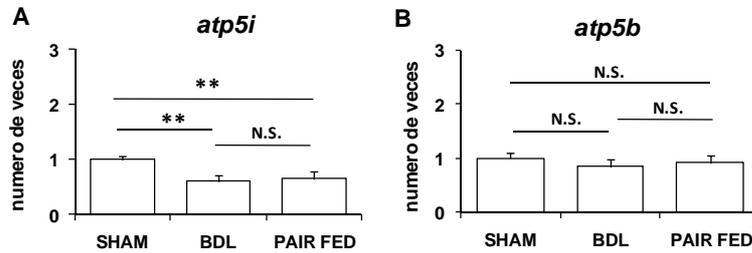


Figura 28. Expresión de genes implicados en la biogénesis mitocondrial, codificados a nivel nuclear. Niveles del mensajero de: A) *atp5i*, B) *atp5b* en hígado SHAM (n=4), BDL (n=7), y PAIR-FED (n=4). La determinación se realizó por PRC cuantitativa.

** = $p < 0,01$; N.S. = diferencia no significativa.

TFAM es responsable del mantenimiento y replicación del ADNmt [Parisi M.A., Clayton D.A., 1991]. La expresión de *tfam* no se vió disminuida en el hígado BDL comparado con el hígado PAIR-FED. Sin embargo, se observa una disminución (-20 %) de la pre-proteína de TFAM (la forma citosólica de 29 kDa) en el grupo BDL comparado con el grupo PAIR-FED ($p < 0,01$). Una disminución similar de la pre-proteína, se observó también comparando el grupo BDL con el grupo SHAM ($p < 0,01$) (Figura 29/A). Un resultado muy relevante fue la marcada disminución de la proteína madura (forma mitocondrial de 25 kDa) en el hígado BDL comparado con el hígado PAIR-FED ($p < 0,01$) o SHAM ($p < 0,01$) (Figura 29/B). Se cuantificó el *import* mitocondrial de TFAM a partir de los valores de densitometría de la pre-proteína y de su forma madura (proteína madura / (proteína madura + pre-proteína), %). En el grupo BDL destaca una casi

completa falta de *import* de la proteína TFAM. Al contrario, el porcentaje de *import* de TFAM en el hígado SHAM es del 61 %, siendo del 49% en el hígado PAIR-FED (**Figura 29/C**).

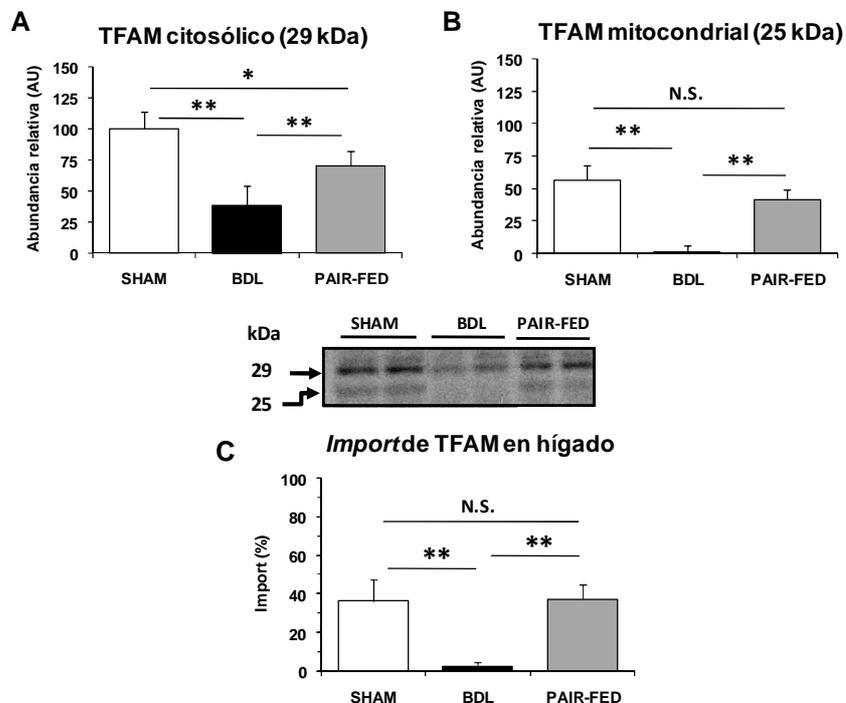


Figura 29. Expresión de TFAM en hígado de rata. La figura muestra la imagen representativa de un *western-blot* de TFAM en hígado. En el panel A) se muestra la densitometría de la forma precursora de TFAM (preproteína). En el panel B) se muestra la densitometría de la forma madura de la proeína (forma mitocondrial de 25 kDa). En el panel C) se muestra el cociente entre la forma madura de TFAM y TFAM total en hígado de rata SHAM (n=4, barra blanca), BDL (n=4, barra negra), y PAIR-FED (n=4, barra gris). ** = p<0,01; * = p<0,05; N.S. = diferencia no significativa.

Para explicar las causas que determinan un fallo en el *import* de TFAM hacia la mitocondria, se determinó la expresión de los principales receptores de membrana mitocondrial - *tomm20* y *tomm70* - por PCR a tiempo real. Además, se determinó la

abundancia proteica de TOMM20 y TOMM70 en mitocondrias aisladas por la técnica de *western-blot*. Se determinó también la abundancia de la proteína TOMM40, el principal canal de *import* de proteínas mitocondriales en la membrana externa. La expresión génica de *tomm20* estaba incrementada en el grupo BDL comparado con el grupo PAIR-FED ($p < 0,01$). Sin embargo, no se observan diferencias significativas entre el grupo BDL y el grupo SHAM (**Figura 30/A**). La expresión génica hepática de *tomm70* no difiere de forma significativa entre el grupo PAIR-FED y el grupo BDL (**Figura 30/B**). Sin embargo, se observa un decremento de su expresión en el grupo BDL comparado con el grupo SHAM ($p < 0,05$) (**Figura 30/B**).

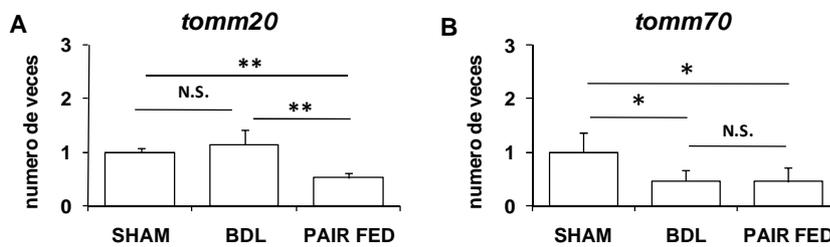


Figura 30. Expresión de genes de receptores de membrana, implicados en el *import* mitocondrial. Niveles del mensajero de: A) *tomm20*, B) *tomm70* en hígado SHAM, (n=4) BDL (n=7), y PAIR-FED (n=4). La determinación se realizó por PRC a tiempo real. ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; N.S. = diferencia no significativa.

Los niveles de proteína de los principales receptores de la membrana mitocondrial externa, TOMM20 y TOMM70, y la proteína canal TOMM40 muestran distintos patrones en los tres grupos. TOMM70 está disminuida en las mitocondrias hepáticas de las ratas BDL comparada con las ratas SHAM ($p < 0,01$) y PAIR-FED ($p < 0,01$) (**Figura 31/A**). Paralelamente, el análisis de TOMM20 por la técnica

de *western-blot* en mitocondrias aisladas muestra posibles modificaciones post-traduccionales de este receptor de membrana. En efecto, en el hígado BDL la movilidad electroforética de la forma mayoritaria de TOMM20 (banda de peso molecular intermedio) está ligeramente incrementada con respecto al hígado SHAM o al hígado PAIR-FED (**Figura 31/C**). Es destacable que en las mitocondria hepáticas del grupo BDL, TOMM40 está marcadamente incrementada, en comparación con los valores encontrados en el grupo SHAM ($p<0,01$) y PAIR-FED ($p<0,01$) (**Figura 31/B**).

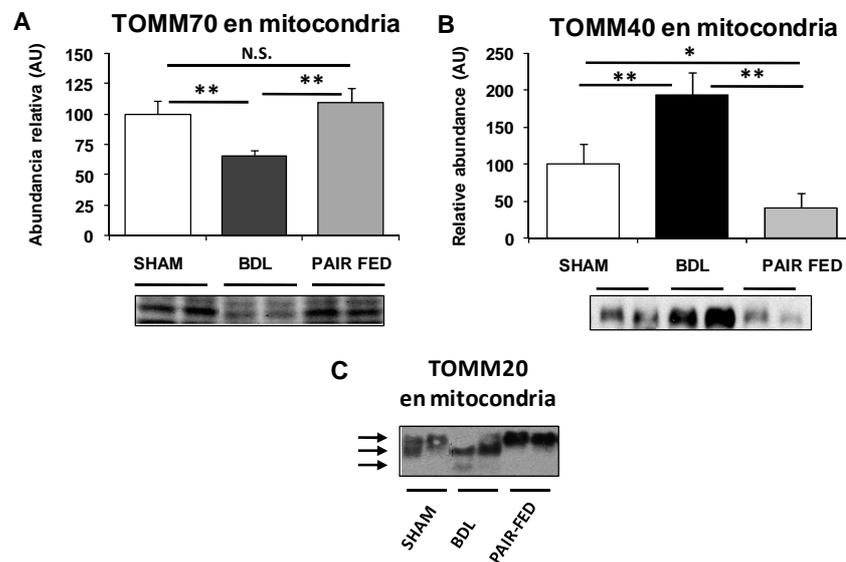


Figura 31. Estudio de la abundancia de proteínas del sistema de import de la membrana mitocondrial externa. La determinación de la abundancia se realizó por la técnica del *western-blot* en mitocondrias aisladas de SHAM (n=4, barra blanca), BDL (n=4, barra negra), y PAIR-FED (n=4, barra gris). Panel: A) TOMM70, B) TOMM40, C) TOMM20.

** = $p<0,01$; * = $p<0,05$; N.S. = diferencia no significativa.

La eficiencia del sistema de *import* mitocondrial es dependiente de un grupo de chaperonas que actúan en el citoplasma y en la mitocondria. Entre las más estudiadas se encuentra la HSP60, de localización prevalentemente mitocondrial, y la HSP70, con localización citoplasmática y mitocondrial. Mediante la técnica del *western-blot*, se estudió la abundancia de HSP60 en mitocondrias aisladas, y la de HSP70 en homogenado total y en mitocondrias aisladas. La abundancia de HSP60 está disminuida en las mitocondrias hepáticas de ratas BDL comparado con las mitocondrias PAIR-FED ($p < 0,01$). Sin embargo, no se observa una disminución significativa de HSP60 en el grupo BDL comparada con el grupo SHAM ($p > 0,05$) (**Figura 32/A**).

La chaperona HSP70 está marcadamente incrementada en homogenado total de hígado en el grupo BDL, comparado con el hígado PAIR-FED o el hígado SHAM ($p < 0,01$) (**Figura 32/B**). No obstante, el incremento de HSP70 en el grupo BDL es sólo citoplasmático, ya que no se detecta la forma mitocondrial de HSP70 en mitocondrias aisladas de hígado BDL. Sin embargo, en los grupos SHAM y PAIR-FED se observa también la forma mitocondrial de HSP70 (**Figura 32/C**).

La distinta regulación de las proteínas del complejo de *import* mitocondrial debería tener importancia funcional, ya que cada una de ellas está mayoritariamente, o exclusivamente, implicada en el *import* de grupos específicos de proteínas.

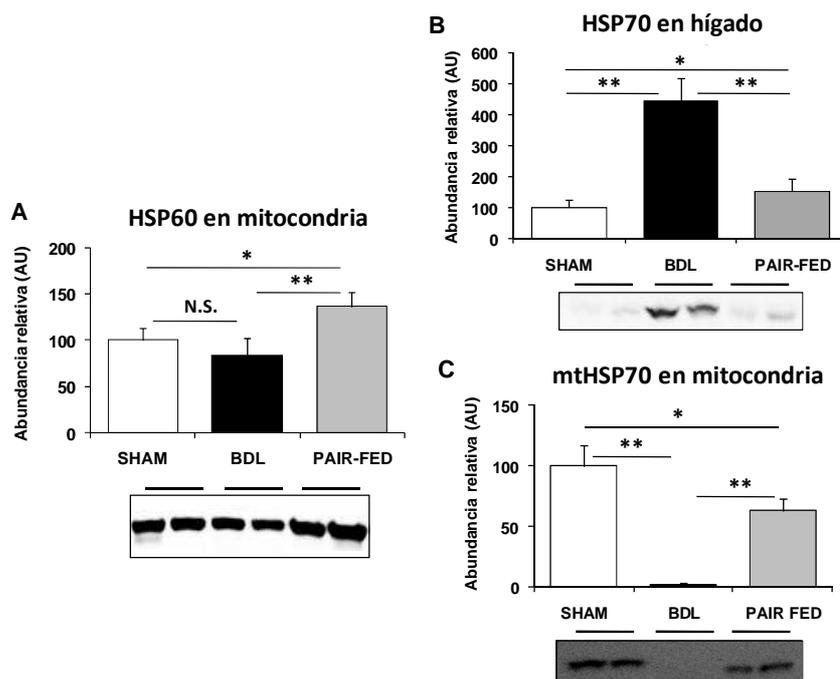


Figura 32. Estudio de las principales chaperonas citosólicas y mitocondriales. La determinación de la abundancia de proteína se realizó por la técnica del *western-blot* en muestras SHAM (n=4, barra blanca), BDL (n=4, barra negra), y PAIR-FED (n=4, barra gris). Panel: A) Imagen representativa de HSP60 en extractos mitocondriales, B) Imagen representativa y densitometría de HSP70 en homogenado de hígado; C) Imagen representativa y densitometría de mtHSP70 en mitocondrias aisladas.

** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; N.S. = diferencia no significativa.

Asimismo, se determinaron los niveles de VDAC1/Porina1, una proteína de la membrana mitocondrial externa, en homogenado total de hígado y en mitocondrias aisladas. El *import* de VDAC1/Porina1 es mayoritariamente dependiente de la proteína canal TOMM40. Los experimentos de *western-blot* en homogenado de hígado muestran un incremento de VDAC1/Porina1 en el grupo BDL comparado con el PAIR-FED ($p < 0,01$) y con el SHAM ($p < 0,01$)

(Figura 33/A). En mitocondrias aisladas se observa el mismo patrón (figura 33/B). Así, el import de VDAC1/Porina1 en mitocondrias de hígado BDL está incrementado en un 30 % comparado con el grupo SHAM ($p < 0,01$). No se observa ninguna diferencia significativa entre el import calculado en el grupo BDL y en el grupo PAIR-FED (Figura 33/C).

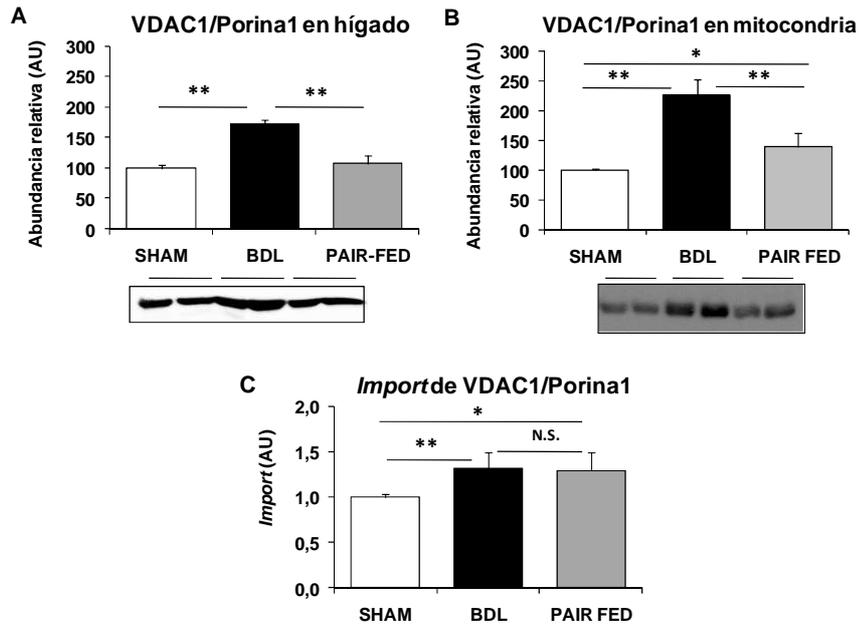


Figura 33. Estudio de la expresión de VDAC/Porina1 en hígado y en mitocondrias hepáticas. La determinación de la abundancia de proteína se realizó por la técnica de *western-blot* en muestras SHAM (n=4, barra blanca), BDL (n=4, barra negra), y PAIR-FED (n=4, barra gris). Panel: A) Imagen representativa y densitometría de VDAC/Porina1 en homogenado de hígado, B) Imagen representativa y densitometría de VDAC/Porina1 en extractos mitocondriales, C) Eficiencia de *import* mitocondrial de VDAC/Porina1 en hígado SHAM, BDL y PAIR-FED. El *import* se calculó atribuyendo un valor arbitrario de 1,00 al grupo control.

** = $p < 0,01$; N.S. = diferencia no significativa.

PGC-1 α , importante factor de transcripción implicado en la regulación de la biogénesis mitocondrial y del metabolismo estaba disminuido a nivel de ARNm y de proteína en el grupo BDL comparado con el grupo PAIR-FED. Para identificar si dicha disminución tiene finalidad protectora o implica una deficiencia en la regulación de la biogénesis mitocondrial del hígado BDL, se estudió la colestasis extrahepática en ratones *knockout* de PGC-1 α (PGC-1 $\alpha^{-/-}$), y se comparó con ratones control (*wt*, *wild type*) de la misma cepa (C57/BL6). El estudio de la supervivencia muestra que la tasa de mortalidad de los ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$ es mucho mayor ya a tiempos cortos (2 días). De hecho la vida media de ratones *wt* es de 16 días, comparado con la vida media de los ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$, que es de sólo 2 días (**Figura 34**).

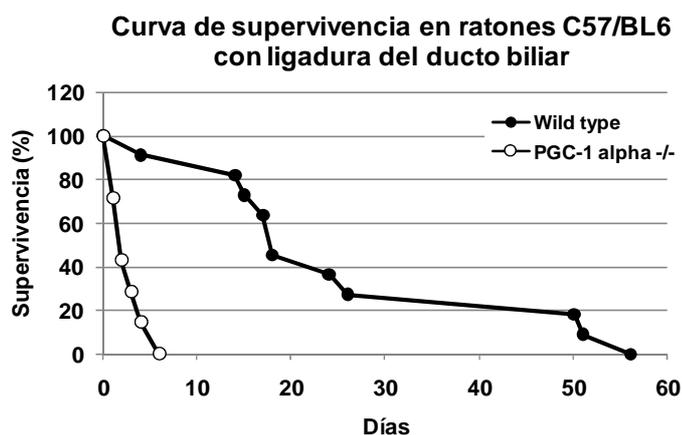


Figura 34. Curva de supervivencia en ratones *knockout* del gen *ppargc-1 α* con ligadura del ducto biliar. La curva con marca negras muestra la supervivencia de animales *wild type* ($n=11$), cuya vida media en respuesta a la colestasis extrahepática es de 16 días. La curva con marcas blancas y línea negra muestra la supervivencia de ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$ ($n=7$) en respuesta a la colestasis extrahepática, cuya vida media es de 2 días.

4.3. PROLIFERACIÓN CELULAR Y BIOGÉNESIS RIBOSOMAL EN LA CIRROSIS BILIAR

Entre las alteraciones morfológicas reconocidas en el hígado cirrótico, quizás la más evidente es la hepatomegalia. La modificación del volumen hepático en la cirrosis es un fenómeno progresivo, asociado al desarrollo de la fibrosis y de la hipertensión portal. En este trabajo se estudió la activación de los mecanismos de regulación de la biogénesis ribosomal a nivel citoplasmático y nuclear en el hígado cirrótico y en hepatocitos aislados. De hecho, en el hígado BDL se observa un incremento de PCNA comparado con el hígado SHAM y PAIR-FED ($p < 0,01$, **Figura 35**).

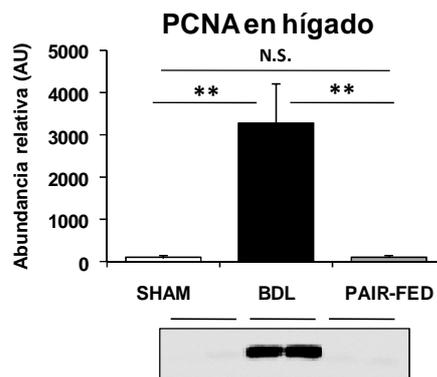


Figura 35. Nivel de proteína de PCNA en hígado. *Western-blot* representativo y densitometría de PCNA, marcador de la transición S-G₂/M, en hígado de rata SHAM (n=4, barra blanca), BDL (n=4, barra negra) y PAIR-FED (n=4, barra gris).

** = $p < 0,01$; N.S. = diferencia no significativa.

Asimismo, en el hígado BDL se observa un incremento del contenido de ADN comparado con el hígado SHAM y PAIR-FED ($p < 0,01$, **Figura 36**).

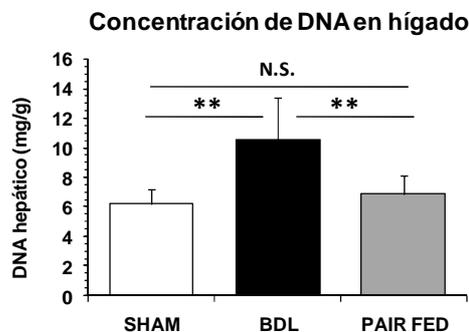


Figura 36. Determinación de la cantidad de DNA en hígado. La grafica muestra la cantidad de DNA extraído en hígado SHAM (n=4, barra blanca), BDL (n=4, barra negra), y PAIR-FED (n=4, barra gris).
** = $p < 0,01$; N.S. = diferencia no significativa.

El estrés oxidativo promueve la activación de múltiples vías de señalización, entre las cuales se encuentran las MAP quinasas (MAPK). En este trabajo se estudiaron los niveles de fosforilación de p38 y ERK1/2. La abundancia proteica de p38 total (forma fosforilada y sin fosforilar) estaba muy incrementada en el hígado BDL con respecto a los hígados SHAM y PAIR-FED ($p < 0,01$, **Figura 37/A**). Asimismo el nivel de p38 fosforilada (fosfo-p38) estaba incrementado en el hígado BDL comparado con el hígado SHAM y PAIR-FED ($p < 0,01$, **Figura 37/B**).

ERK1/2 muestra un perfil parecido a p38. En las muestras de hígado BDL se observa un incremento de ERK1/2, comprado con el grupo PAIR-FED y con el grupo SHAM ($p < 0,01$, **Figura 37/C**). En el hígado BDL se observa además un incremento de los niveles de

ERK1/2 fosforilado, comparado con el hígado SHAM y con el hígado PAIR-FED ($p < 0,01$, **Figura 37/D**). Por lo tanto, ERK1/2 y p38 tienen mayor actividad quinasa en el hígado BDL por 2 mecanismos, siendo el primero un incremento de la expresión proteica y el segundo un mayor nivel de fosforilación.

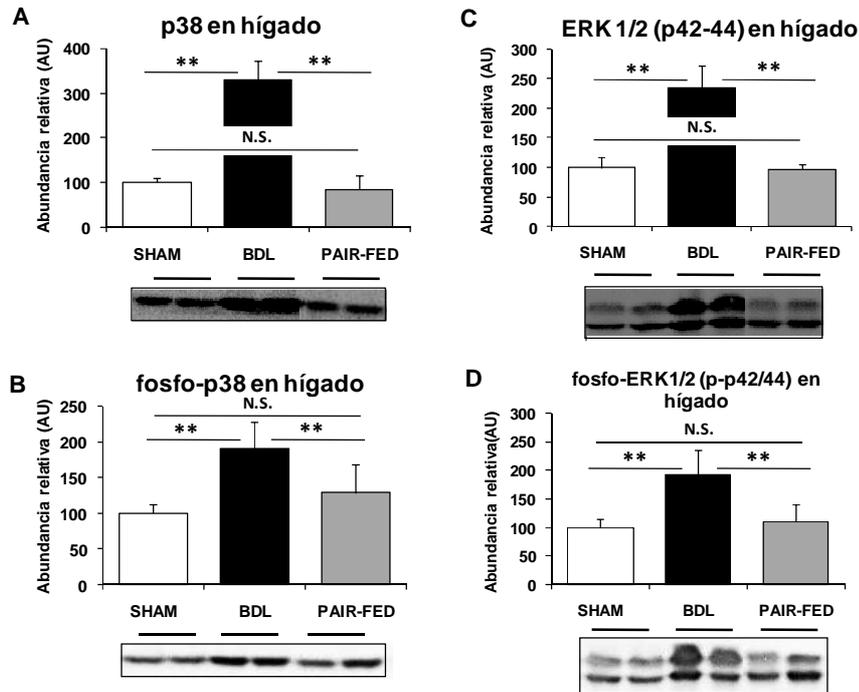


Figura 37. Estudio de la fosforilación de la MAP quinasa p38 y ERK1/2. Determinación de los niveles de p38 y ERK1/2 por *western-blot* y cuantificación densitométrica en hígado SHAM (n=4, barra blanca), BDL (n=4, barra negra), y PAIR-FED (n=4, barra gris). Panel A) p38 total en hígado de rata. Panel B) forma fosforilada de p38 en hígado de rata. Panel C) ERK1/2 total en hígado de rata. D) Forma fosforilada de ERK1/2 en hígado de rata. ** = $p < 0,01$; N.S. = diferencia no significativa.

Las MAP quinasa pueden estar activadas por estrés oxidativo o nitrosativo [Carreras M.C., Poderoso J.J., 2007; Benassi B. *et al.*, 2006]. El estrés nitrosativo es dependiente de niveles elevados

de especies reactivas del oxígeno, además de niveles incrementados de NO \cdot . Por lo tanto, se determinó el nivel de proteínas nitradas en hígado de rata como parámetro indirecto de estrés oxidativo. En el hígado SHAM y el hígado PAIR-FED se observa un menor nivel de proteínas nitradas (bandedo de menor intensidad en el experimento de *western-blot*) con respecto al hígado BDL. Además, en el hígado BDL se observa un mayor número de proteínas nitradas (observadas como bandas adicionales), comparado con el del hígado SHAM y el hígado PAIR-FED (**Figura 38**). Este resultado muestra un incremento del estrés nitrosativo en el hígado BDL.

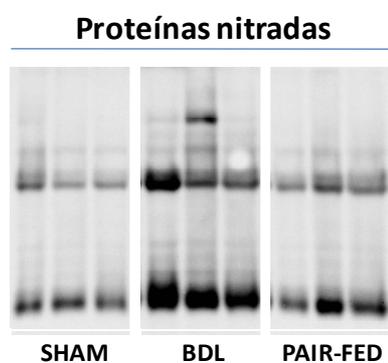


Figura 38. Determinación de los niveles de proteínas nitradas en hígado. En la figura se muestra un *western-blot* representativo de los niveles de proteínas nitradas en hígado SHAM, BDL, y PAIR-FED. Se utilizó un anticuerpo anti-nitrotirosina.

ERK1/2 es una importante reguladora de la proliferación celular, ya que induce la fosforilación de c-MYC y actúa sobre la transcripción de ARNr. En nuestro modelo de cirrosis experimental observamos un incremento de la fosforilación de c-MYC (fosfo-c-MYC) en muestras BDL en comparación con las muestras SHAM y

PAIR-FED ($p < 0,01$, **Figura 39**). Este resultado explicaría la actividad proliferativa del hígado BDL.

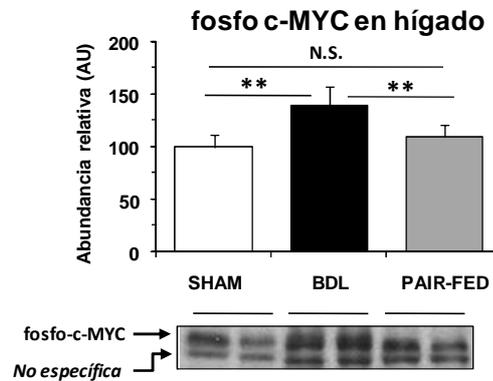


Figura 39. Estudio de la fosforilación c-MYC. En la figura se presenta un *western-blot* representativo y cuantificación densitométrica de la forma fosforilada de c-MYC (fosfo-c-MYC), en hígado SHAM (n=4, barra blanca), BDL (n=4, barra negra), y PAIR-FED (n=4, barra gris).

** = $p < 0,01$; N.S. = diferencia no significativa.

Las funciones de c-MYC están reguladas por proteínas *partner* (MAX) y represores específicos (MAD-1, pRB). En este estudio encontramos un nivel mayor de la proteína MAD-1 en homogenados de hígado BDL comparado con el de hígado PAIR-FED ($p < 0,01$, **Figura 40**). MAD-1 tiene su actividad biológica en el núcleo, donde se une a c-MYC e impide su capacidad de transactivación de genes [Poortinga G. *et al.*, 2004].

c-MYC es responsable de la transcripción de *ubf1*, factor de transcripción implicado en la biogénesis ribosomal [Poortinga G. *et al.*, 2004]. En este estudio observamos un mayor nivel de fosforilación de c-MYC en hígado BDL. De acuerdo con estos resultados, se observa una mayor nivel de expresión génica de *ubf-1*

en el hígado BDL comparado con el hígado PAIR-FED ($p < 0,01$, **Figura 41/A**). En el hígado BDL también se encontró una mayor expresión proteica de UBF comparado con el hígado PAIR-FED ($p < 0,01$, **Figura 41/B**). Este resultado confirma que c-MYC es activo en el hígado BDL y promueve la biogénesis ribosomal.

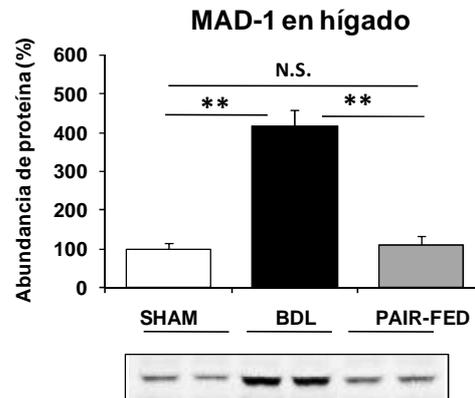


Figura 40. Estudio de la abundancia proteica de MAD-1. Western-blot representativo y cuantificación densitométrica de MAD-1 en hígado SHAM (n=4, barra blanca), BDL (n=4, barra negra), y PAIR-FED (n=4, barra gris). ** = $p < 0,01$; N.S. = diferencia no significativa.

UBF regula la expresión de varios genes implicados en la biogénesis ribosomal. Sin embargo su actividad está regulada por pRB, que tiene función inhibidora [Voit R. *et al.*, 1997]. En el hígado BDL se observa ausencia de la proteína pRB. De hecho no se detectan ni la forma fosforilada, ni la forma sin fosforilar en el hígado BDL. Sin embargo, la proteína de 115-120 kDa está presente en muestras de hígado SHAM y PAIR-FED. Debe señalarse que el anticuerpo utilizado para detectar pRB, reconoce una proteína de menor tamaño. La proteína, que tiene una movilidad electroforética de ~48 kDa, sólo se detecta en el grupo BDL (**Figura 42**). En estudios previos se observó

que la activación de proteasas específicas (de la familia de las caspasas) degrada la proteína pRB, liberando una proteína de menor tamaño (~48 kDa). Por lo tanto, en el hígado BDL parece perderse la inhibición de UBF por la degradación de pRB.

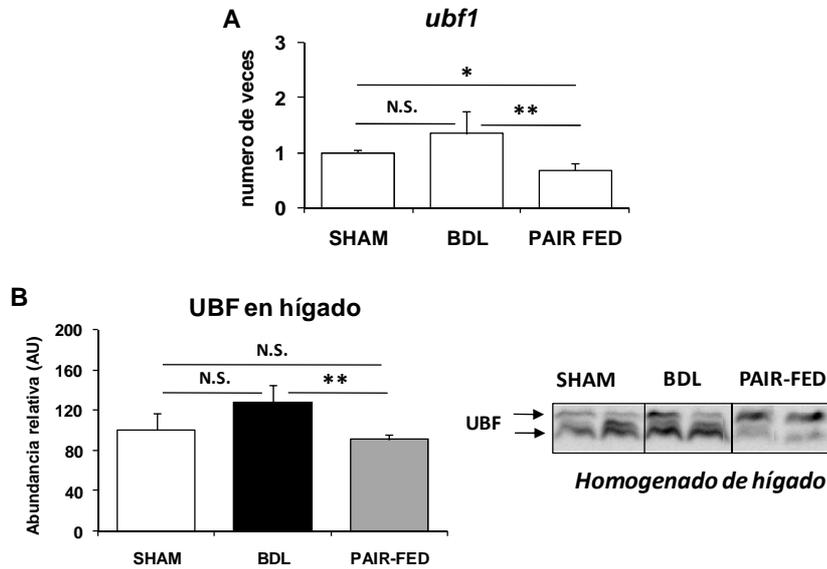


Figura 41. Estudio de UBF, gen diana de c-MYC. Panel A) Expresión del transcrito de UBF en muestras de hígado SHAM (n=4), BDL (n=7) y PAIR-FED (n=4), determinado por PCR a tiempo real. Panel B) *western-blot* representativo y cuantificación densitométrica de UBF en hígado SHAM (n=4, barra blanca), BDL (n=4, barra negra), y PAIR-FED (n=4, barra gris). ** = p<0,01; * = p<0,05; N.S. = diferencia no significativa.

Para determinar si en el hígado cirrótico se observa la promoción de un programa completo de biogénesis ribosomal, se estudió la expresión de genes de proteínas ribosomales. En el hígado BDL se observa un incremento de la expresión de varios genes de la subunidad ribosomal 60S (*rplp0*, *rpl30*, *rpl32*), comparado con el grupo PAIR-FED (p<0,01, **Figura 43/A/B/C**). Se determinó también la expresión del gen *rps16*, que codifica una proteína de la subunidad

ribosomal 40S. En el hígado BDL, la expresión de *rps16* estaba incrementada con respecto al hígado PAIR-FED ($p < 0,05$) y SHAM ($p < 0,01$, **Figura 43/D**).

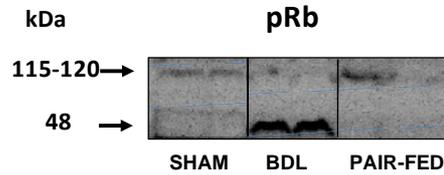


Figura 42. Estudio de pRB en hígado. En la figura se muestra un *western-blot* representativo de pRB en hígado SHAM (n=4, barra blanca), BDL (n=4, barra negra), y PAIR-FED (n=4, barra gris). En las muestras BDL el anticuerpo reconoce una proteína de menor masa molecular (~48 kDa) comparado con la masa de la proteína de las muestras SHAM y PAIR-FED (115-120 kDa).

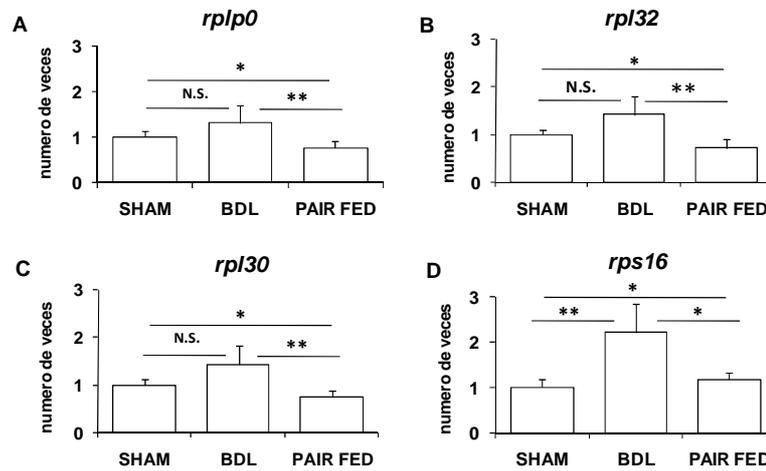


Figura 43. Expresión de genes de proteínas ribosomales. Niveles del mensajero de: A) *rplp0*, B) *rpl32*, C) *rpl30*, D) *rps16* en hígado SHAM (n=4), BDL (n=7), y PAIR-FED (n=4). La determinación se realizó por PRC cuantitativa.

** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; N.S. = diferencia no significativa.

No obstante, no se observan diferencias significativas entre las poblaciones de ARNr en el grupo SHAM, BDL y PAIR-FED (**Figura 44**). Este resultado muestra que un incremento en la síntesis de ARNr supone finalmente su correcto procesamiento a las formas maduras, que componen las subunidades ribosomales 40S y 60S.

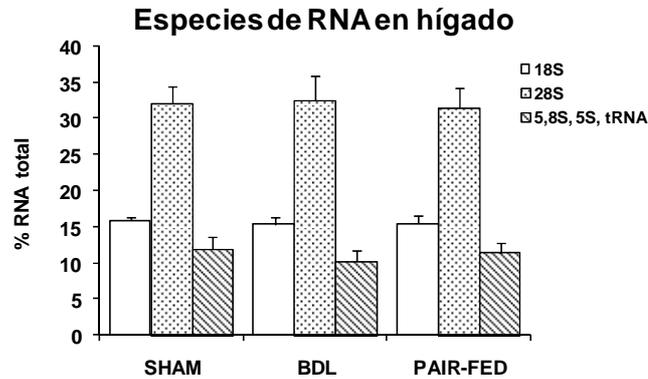


Figura 44. Estudio cromatográfico de las distintas especies de ARNr y de transferencia. En la figura se muestra la cuantificación relativa del ARNr 18S, 28S, 5,8S y 5S mediante la técnica de cromatografía capilar. El análisis incluye también los niveles de ARNt.

Con el fin de valorar procesamiento y transporte del ARNr, y su ensamblaje en ribosomas, se determinó también la expresión de genes implicados en el transporte de proteínas ribosomales, y el procesamiento del ARNr precursor. Así, en el hígado BDL se observó un incremento de la expresión de *b23*, *fbl*, y *EIF6*, comparado con el hígado PAIR-FED o SHAM ($p < 0,01$, **Figura 45/A/B/C**). Estos resultados muestran que el hígado cirrótico promueve un claro perfil de expresión de genes implicados en la biogénesis ribosomal.

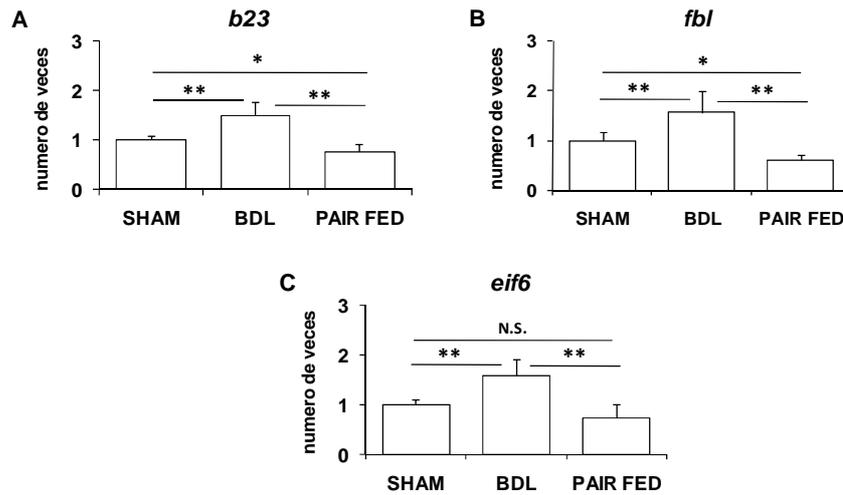


Figura 45. Expresión de genes de proteínas reguladoras, implicadas en la biogénesis ribosomal. Niveles del mensajero de: A) *b23*, B) *fbl*, C) *eif6* en hígado SHAM (n=4), BDL (n=7), y PAIR-FED (n=4). La determinación se realizó por PRC cuantitativa.

** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; N.S. = diferencia no significativa.

En este estudio se midieron también los niveles de importantes proteínas reguladoras negativas de la proliferación y promotoras de la apoptosis. En el hígado BDL se observa una marcada fosforilación de la proteína p53. Sin embargo, en los hígados SHAM y PAIR-FED p53 muestra niveles muy bajos de fosforilación (**Figura 46/A**). La proteína p53 es además responsable de promover la transcripción desde el promotor de p21. Por ello, en este estudio se determinaron los niveles de p21 total en homogenado de hígado. En los hígados BDL se observó un incremento de p21 de 2,5 veces comparado con los valores medidos en hígados SHAM y PAIR-FED (**Figura 46/B**).

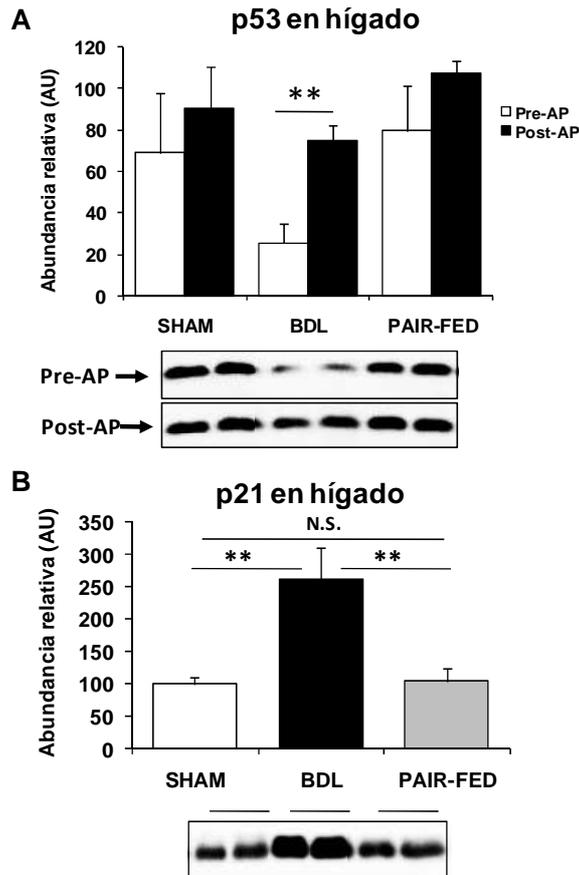


Figura 46. Expresión de proteínas implicadas en la apoptosis y el arresto del ciclo celular. Panel A) En la figura aparece un *western-blot* representativo y su densitometría de p53 total en hígado de rata SHAM, BDL, y PAIR-FED medida antes (pre-AP) y después (post-AP) el tratamiento de la membrana con fosfatasa alcalina. Panel B) *western-blot* representativo y su densitometría de p21 en hígado de rata SHAM, BDL, y PAIR-FED. ** = $p < 0,01$; N.S. = diferencia no significativa.

DISCUSIÓN

Capítulo quinto

5.1. DESARROLLO DE FIBROSIS HEPÁTICA EN LA CIRROSIS BILIAR SECUNDARIA

La colestasis extrahepática crónica experimental está caracterizada por marcadas alteraciones morfológicas y ultraestructurales, compatibles con las observaciones en pacientes con cirrosis hepática [Rodríguez-Garay E.A., 2003]. El hígado dañado responde a los estímulos con mecanismos de reparación al daño, que se perpetúan y promueven la fibrosis hepática. En este estudio se confirma que el modelo experimental de ligadura del ducto biliar común es causa de fibrosis, ya que promueve la activación de genes implicados en la activación de las HCS y finalmente la síntesis de ECM. Por ello, la colestasis extrahepática experimental crónica es un modelo aceptado de cirrosis biliar secundaria.

La enzima ACE-1 es responsable de la conversión de angiotensinógeno a angiotensina, que determina una respuesta vasoconstrictora [Enseleit F. *et al.*, 2001]. Ya en la década de los '70 se observó una elevación de los niveles séricos de ACE en pacientes con sarcoidosis pulmonar, que está asociada con una mayor abundancia de colágeno [Lieberman J., 1975]. Se tuvieron que esperar más de 20 años para establecer un papel de ACE en la fibrosis hepática, cuando se demostró que la administración de inhibidores de ACE tiene efectos anti-fibróticos en modelos de cirrosis inducida por CCl₄, por BDL, o suero de cerdo [Wei HS. *et al.* 2000; Jonsson J.R. *et al.*, 2001; Yoshiji H. *et al.*, 2001]. En nuestro

modelo de cirrosis biliar secundaria a colestasis crónica, se observa un marcado incremento de la expresión hepática de *ace-1*. Este resultado concuerda con precedentes observaciones en ratas BDL [Paizis G. *et al.*, 2002; Herat C.B. *et al.*, 2007], y muestra que el incremento de actividad de ACE-1 durante la progresión de la fibrosis hepática es dependiente de un incremento de su expresión.

El incremento de ACE-1 en hígado de ratas BDL es responsable de la formación de ANG-1 y favorece su conversión a ANG-2, y finalmente activa el receptor AT1-R [Herat C.B. *et al.*, 2007; Yang L. *et al.*, 2005], que se expresa en las células de Kupffer y en las HSC [Leung P.S. *et al.*, 2003]. La estimulación de HSC con ANG-2 promueve la expresión de *tgf-β1* [Yoshiji H. *et al.*, 2001], *timp-1* [Yoshiji H. *et al.*, 2003], *col-1α1* [Ohishi T. *et al.*, 2001], la activación de NF-κB [McAllister-Lucas L.M. *et al.*, 2007], entre otros. Nuestros resultados muestran un marcado incremento de la expresión de *tgf-β1* (13 x), *col-1α1* (27 x), y *timp-1* (32 x). TGF-1β1 promueve el incremento de α-SMA en células HSC-T6 [Chong L.W. *et al.*, 2006], fenómeno asociado a la pérdida del estado de quiescencia de las HSC y a su transformación en miofibroblasto. En nuestro modelo de cirrosis experimental se observa el marcado incremento de actina en hígado, atribuido al probablemente incremento de α-SMA por acción de las HSC. Por lo tanto, en el hígado con colestasis crónica se observa una intensa regulación positiva de la fibrogénesis.

Distintos estudio atribuyen a NF-κB un papel destacado en la regulación de la fibrogénesis hepática. Se ha descrito que la ANG-2 es responsable de la activación de NF-κB a través de una ruta de

señalización que involucra AT-1R, CARMA3, y BCL-10 [McAllister-Lucas L.M. *et al.*, 2007]. Este mecanismo promueve la liberación de MCP-1, TNF- α e IL-6 por las HSC y la liberación de TNF- α , IL- β , e IL-6 por el hepatocito [McAllister-Lucas L.M. *et al.*, 2007]. En el hepatocito, NF- κ B promueve la síntesis de angiotensinógeno, que actuaría como potente mecanismo de retroalimentación positiva sobre la fibrogénesis. Durante el desarrollo de la fibrosis NF- κ B transloca también al núcleo, donde actúa sobre el promotor de *tnf- α* [Li X. *et al.*, 2007]. En nuestro estudio se observa una marcada fosforilación de I κ B- α en el hígado cirrótico, asociado a un incremento del nivel de la subunidad RelA/p65 de NF- κ B. Además, como previsible, se nota la migración de RelA/p65 al núcleo, donde ejerce su actividad transcripcional. La activación de NF- κ B promueve la fibrosis también por un mecanismo dependiente de TGF-1 β 1, ya que TGF-1 β 1 tiene la capacidad de inhibir la expresión de MMP-9 *in vitro*. Este fenómeno es dependiente de su interacción con NF- κ B, que tiene a su vez sitio de unión en el promotor de MMP-9 [Ogawa K. *et al.*, 2004]. Esto implica que la activación de NF- κ B en el hígado colestásico es un fenómeno clave para el desarrollo de la fibrosis. En conjunto, estos resultados muestran que el modelo de colestasis crónica por ligadura del ducto biliar es adecuado para el estudio de la fibrosis y la cirrosis biliar.

5.2. BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL EN LA CIRROSIS BILIAR SECUNDARIA

La colestasis extrahepática induce modificaciones funcionales en la mitocondria, caracterizadas por una menor eficiencia de la cadena de transporte mitocondrial [Goncalves I. *et al.*, 1995], una menor producción de ATP [Tanaka A. *et al.*, 1995; Younes R.N. *et al.*, 2007] y un incremento del estrés oxidativo [Vendemiale G. *et al.*, 2002; Serviddio G. *et al.*, 2004]. Un estudio del grupo de Krähenbühl S. describe una importante proliferación mitocondrial en las primeras semanas después de la ligadura del ducto biliar común [Forestier M. *et al.*, 1997], posiblemente relacionada con una disminución de la eficiencia energética mitocondrial. Sin embargo, entre la semana 3 y 4 de colestasis, la densidad mitocondrial en hígado (el peso mitocondrial por gramo de tejido hepático) disminuye un ~50 %.

En el presente estudio, se confirma la pérdida de mitocondrias en un modelo de colestasis crónica. Corroboramos además los resultados por PCR a tiempo real, observando una disminución del cociente entre ADN mitocondrial y ADN nuclear. En los dos casos se observó una pérdida de masa mitocondrial del 50-60% en el hígado colestásico, coherente con las afirmaciones de Forestier y cols. [Forestier M. *et al.*, 1997]. Además, dicha alteración está relacionada con la disfunción de los complejos respiratorios I, III, y IV, codificados por el ADNmt en la colestasis en rata [Mandel H. *et*

al., 2001]. Por ello, nos propusimos estudiar los mecanismos de regulación de la biogénesis mitocondrial en la rata cirrótica.

Durante la evolución de la colestasis la rata disminuye voluntariamente su ingesta calórica en un ~20%. Dado que la expresión de genes que regulan la biogénesis mitocondrial está regulada por ingesta calórica, decidimos incluir un grupo PAIR-FED. En este grupo se observó un adaptación metabólica a la ingesta calórica disminuida, con incremento de la deacetilasa SIRT-1, el factor de transcripción PGC-1 α , y de uno de sus genes diana, PDK, enzima implicada en la regulación del metabolismo del piruvato [Ma K. *et al.*, 2005; Wende AR *et al.*, 2005]. El resultado es coherente con estudios previos, que muestran una regulación positiva de *ppargc-1 α* durante la restricción calórica en roedores [Rodgers J.T. *et al.*, 2005] y humanos [Civitarese A.E. *et al.*, 2007]. El incremento de PGC-1 α en el grupo PAIR-FED muestra una preferencia en la elección de sustratos hacia los ácidos grasos [Rodgers J.T., Puigserver P., 2007].

En el hígado colestásico no se observa una respuesta metabólica adaptativa a la restricción calórica, lo que supone un fallo en la regulación del metabolismo mitocondrial. PGC-1 α es un regulador clave del metabolismo [Houten S.M., Auwerx J., 2004]. Promueve la biogénesis mitocondrial a nivel nuclear, ya que es capaz de inducir la expresión de *nrf-1* y *gabh- α* , y coopera en la transactivación del promotor de *tfam* por NRF-1 [Wu Z. *et al.*, 1999]. En el hígado colestásico se observa una falta de inducción de *ppargc-1 α* , observado también a nivel de proteína. Además no se observa un incremento de SIRT-1 y/o PDK, como observado en el hígado PAIR-

FED. Sin embargo, el hígado colestásico muestra una regulación positiva de *nrf-1* y *gabp- α* comparado con el grupo PAIR-FED. Esto implica una alteración de la regulación de la biogénesis mitocondrial a nivel nuclear, con posible implicación sobre la regulación metabólica en la colestasis.

NRF-1 es regulador positivo de la biogénesis mitocondrial, ya que es capaz de promover la expresión de *cycs* [Evans M.J., Scarpulla R.C., 1989], *tfam* [Virbasius J.V., Scarpulla R.C., 1994], *alas1* [Braidotti G *et al.*, 1993], y las 10 subunidades de la citocromo c oxidasa codificadas por el núcleo [Dhar S.S. *et al.*, 2008]. Su actividad transcripcional es dependiente de su fosforilación y translocación nuclear. En el hígado BDL se observa una completa fosforilación de NRF-1 y su translocación nuclear. Sin embargo, en el hígado BDL no se evidencia un incremento de sus genes diana, *cycs* y *tfam*. En el caso de *tfam* es probable que la pérdida parcial de GABP- α , junto con un menor nivel de proteína y actividad de PGC-1 α , juegue un papel relevante en su expresión. De hecho, se ha demostrado que PGC-1 α tiene un papel relevante en la regulación de la actividad del promotor de *tfam* [Wu Z. *et al.*, 1999]. Como confirmación del fallo en la capacidad de transactivación de NRF-1, la expresión génica de *cycs* no está incrementada en el hígado BDL comparado con el PAIR-FED. Esto indica que NRF-1 no mantiene su actividad transcripcional a pesar de su fosforilación y translocación nuclear. El análisis de la expresión de otros genes mitocondriales codificados por el genoma nuclear no muestra una alteración en el hígado BDL. La expresión de *atp5i*, *atp5b*, y *pol- γ* no varía en el grupo BDL comparado con el grupo

PAIR-FED. Esto evidencia aparentemente una regulación normal de la biogénesis mitocondrial a nivel nuclear en el hígado BDL.

Sin embargo, la regulación de la expresión de los genes mitocondriales en el hígado BDL es bien distinta. La falta de inducción de genes mitocondriales por NRF-1 se debe probablemente a una regulación inhibitoria. Hasta la fecha se han descrito tres mecanismos de regulación de NRF-1: el estrés oxidativo, el estrés energético, y la fosforilación por el complejo ciclina D1/CDK-4. En células de hepatoma de rata H4IIE, el estrés oxidativo inducido por tert-butil hidropéroxido induce la fosforilación de AKT(Ser473) y la translocación de NRF-1 al núcleo [Piantadosi C.A., Suliman H.B., 2006]. Sin embargo, en el hígado colestásico el estrés oxidativo [Serviddio G. *et al.*, 2004; Ebrahimkhani M.R. *et al.*, 2005], no está asociado a un incremento de fosfo-AKT(Ser473). Un mecanismo alternativo de activación de NRF-1 es dependiente de un estrés energético, que induce una rápida fosforilación de AMPK y el incremento de la capacidad de unión a de NRF-1 al ADN [Bergeron R. *et al.*, 2001]. En el hígado colestásico se observa un menor nivel del sólo fosfo-AMPK. Esto apoyaría la hipótesis de una fosforilación inhibitoria de NRF-1 causada por el complejo ciclina D1/CDK-4. De hecho, este mecanismo es responsable de la inhibición de la transactivación del promotor de *tfam* por NRF-1 [Wang C. *et al.*, 2006]. En el hígado colestásico no se observa una inducción de *tfam* a pesar de la fosforilación de NRF-1; por ello, el incremento de CDK-4 puede explicar la pérdida de control de NRF-1 sobre la biogénesis mitocondrial.

TFAM es proteína de la familia HMG [Zhang Q., Wang Y., 2008]; tiene la característica de unirse al ADN, envolviéndolo y desenvolviéndolo, actuando de forma similar a las histonas [Parisi M.A., Clayton D.A., 1991]. Su presencia es esencial para el desarrollo embrionario [Larsson N.G. *et al.*, 1997]. En nuestros experimentos se observa una moderada disminución de la pre-proteína TFAM (forma precursora) en el hígado colestásico. Además, prácticamente no se detecta la proteína madura de TFAM (forma mitocondrial) por la técnica de *western-blot* en hígado BDL. Este resultado es coherente con la disminución del cociente entre ADNmt y ADNn en el hígado colestásico. Un fenotipo similar se observa también en el ámbito clínico; pacientes con colestasis infantil muestran una disminución del cociente ADNmt/ADNn [Ducluzeau P.H. *et al.*, 1999]. Sin embargo, no establece una relación de causa efecto. El ADNmt y TFAM se estabilizan recíprocamente: una pérdida del primero puede ser causa de una disminución de TFAM o viceversa [Davis A.F. *et al.*, 1996; Alam T.I. *et al.*, 2003]. Estos resultados crean una importante conexión entre la colestasis crónica y el desarrollo de carcinoma hepatocelular, enfermedad asociada a mutaciones y pérdida de ADNmt [Yin P.H. *et al.*, 2004]. Por ello, no se excluye que haya una continuidad entre la alteración de la función mitocondrial en la colestasis temprana, y las deleciones del genoma mitocondrial encontrado en etapas más tardías.

Para explicar la marcada disminución de la forma madura de TFAM, se estudiaron tanto proteínas clave del sistema de *import* de la membrana mitocondrial externa, como chaperonas citosólicas y mitocondriales. En el hígado colestásico se observa una alteración de

los niveles proteicos de los receptores de membrana TOMM20 y TOMM70, y de la proteína canal TOMM40. Los mecanismos de regulación implicados actúan a nivel post-traducciona, ya que no se observa una marcada alteración de la expresión de *tomm20* y *tomm70* en el hígado colestásico. Esta hipótesis es coherente con los hallazgos del grupo de Hood D.A. [Rungi A.A. *et al.*, 2002] en fibroblastos de pacientes con enfermedad mitocondrial múltiple (MMD, *multiple mitochondrial disease*), que mostraban una disminución de la traducción de algunas proteínas implicadas en el *import* mitocondrial. Ulteriores estudios son necesarios para aclarar las causas de la disminución de TOMM70 y de la modificación post-traducciona de TOMM20, ya que pueden estar implicadas en alteraciones del *import* de TFAM y de otras proteínas mitocondriales como la mtHSP70. Al mismo tiempo, en el hígado colestásico se observa un marcado incremento de TOMM40. Mecanismos compensatorios en el *import* mitocondrial son también evidentes en mioblastos de ratón deplecionados de ADNmt (Rho⁻), que se caracterizan por bajos niveles de TFAM [Joseph A.M. *et al.*, 2004].

HSP70, chaperona citosólica y mitocondrial, mantiene las proteínas que entran en la mitocondria en una estructura desplegada [Hood D.A. *et al.*, 2003], siendo HSP60 encargada de restituir la estructura una vez llegada a la matriz [Hallberg E.M. *et al.*, 1993]. En el hígado colestásico se observa un marcado incremento de HSP70 en homogenado de hígado. Sorprendentemente, HSP70 no es detectable en los extractos mitocondriales de ratas BDL. Además se observa una disminución de HSP60 en mitocondrias BDL. Estos hallazgos pueden explicar el fallo de *import* de TFAM, proteína dirigida a la matriz

mitocondrial. Sin embargo, considerando que HSP60, HSP70 y TFAM son proteínas dirigidas a la matriz mitocondrial, es posible explicar el fenómeno en términos más generales. Las proteínas dirigidas a la matriz son importadas por un mecanismo dependiente de la concentración de ATP mitocondrial [Rassow J. *et al.*, 1991] y del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) [Martin J. *et al.*, 1991]. En el hígado colestásico, los dos “motores” del *import* no pueden actuar correctamente, ya que la mitocondrias producen menos ATP [Tanaka A. *et al.*, 1995; Younes R.N. *et al.*, 2007], y tienen un menor $\Delta\psi_m$ [Serviddio G. *et al.*, 2004]. Las sales biliares, presentes en altas concentraciones en el hígado colestásico, son causa la disminución del $\Delta\psi_m$ [Rolo A.P. *et al.*, 2000; Ferreira M. *et al.*, 2005], con posibles repercusiones sobre el *import* mitocondrial. De hecho, en mitocondrias aisladas incubadas con CCCP, una molécula ionófora que disipa el $\Delta\psi_m$, se inhibe el *import* de HSP60 [Singh B. *et al.*, 1990], HSP70 [Singh B. *et al.*, 1997] y TFAM [Gensler S. *et al.*, 2001]. Una alterada composición lipídica de la membrana mitocondrial interna [Krähenbühl S., *et al.*, 1992], tal y como se observa en la colestasis, puede ser una importante causa de la pérdida de $\Delta\psi_m$, contribuyendo al fallo de *import* mitocondrial.

Para averiguar si el fallo de *import* mitocondrial en el hígado colestásico es específico de las proteínas de matriz o afecta a otras proteínas, se estudió el *import* de una proteína de la membrana mitocondrial externa: VDAC1/Porina1. En el hígado colestásico se detectó un incremento de aproximadamente un 75 % en VDAC1, siendo dicho aumento todavía más evidente en mitocondrias aisladas. Este resultado muestra que la eficiencia de *import* de

VDAC1/Porin1, y probablemente de otras proteínas no dirigidas a la matriz, se incrementa. Este resultado sería coherente con el incremento de TOMM40 en el hígado BDL. De hecho, el *import* de VDAC1/Porin1 es principalmente dependiente de TOMM40 [Krimmer T. *et al.*, 2001]. En conjunto, estos resultados muestran un fallo en el *import* de proteínas dirigidas a la matriz, y que la distinta regulación de las proteínas TOMM favorece mecanismos compensatorios para el *import* de otras proteínas mitocondriales.

En conclusión, estos resultados muestran que la colestasis crónica está asociada a una importante alteración de la biogénesis mitocondrial y a una disminución del ADN mitocondrial. Entre los mecanismos responsables, el fallo de *import* de proteínas dirigidas a la matriz mitocondrial es causa y a la vez consecuencia de una alteración progresiva de la función mitocondrial.

5.3. BIOGÉNESIS RIBOSOMAL EN LA CIRROSIS BILIAR SECUNDARIA

El hígado BDL tiene características altamente proliferativas. A nivel macroscópico, el órgano crece aproximadamente un 25 % cada semana desde la inducción de la colestasis. El hígado normal tiene una actividad proliferativa muy baja; sin embargo, responde rápidamente a estímulos regenerativos [Brenner D.A. *et al.*, 1998]. En el hígado cirrótico se observa una marcada sobreexpresión de las proteínas involucradas en la transición entre la fase G₁ y la fase S del

ciclo celular. De hecho, en el hígado BDL se observa un incremento de alrededor de 6 veces en CDK-4 y un incremento de 30 veces en PCNA. Una alterada regulación del ciclo celular, con un marcado incremento de la entrada en fase S promueve una mayor síntesis de ADN, tal y como se observa en los hígados colestásicos. Este resultado confirma los hallazgos de un estudio previo, donde se observó el incremento de PCNA en hígado BDL [Lunz JG 3rd. *et al.*, 2005], un marcador específico de proliferación celular. Todavía no se conocen los mecanismos que promueven la intensa estimulación de la maquinaria de síntesis proteica. Un objetivo de este estudio fue dar luz a los elementos de control de la biogénesis ribosomal en el hígado cirrótico, imprescindible para la división celular.

El estrés oxidativo moderado promueve la proliferación celular; sin embargo, elevados niveles de H₂O₂ son promotores de apoptosis [Davies K.J., 1999]. La quinasa ERK1/2 es una quinasa activa en alrededor del 30 % de los tumores humanos y está implicada en mecanismos de crecimiento y proliferación celular. ERK1/2 se puede activar por estrés oxidativo [Benassi B. *et al.*, 2006], y está activo en condiciones de estrés nitrosativo [Iwagaki A. *et al.*, 2003]. En el presente estudio, se observó un estrés nitrosativo hepático en el hígado BDL. Estudios previos demostraron que existe estrés oxidativo en pacientes con colestasis crónica [Vendemiale G. *et al.*, 2002] y en ratas BDL [Serviddio G. *et al.*, 2004], tal y como demuestran un decremento del nivel de GSH e incremento del glutatión oxidado y de malondialdehído (MDA) hepáticos.

En el hígado cirrótico se observa inducción y fosforilación de p38 y ERK1/2, importantes MAPK reguladas por estrés oxidativo [Gigliozzi A. *et al.*, 2004; Svegliati-Baroni G. *et al.*, 2003]. ERK1/2 es responsable de activar c-MYC por fosforilación [Taniguchi F. *et al.*, 2003]. De acuerdo con nuestra hipótesis, en el hígado con colestasis crónica se observó un incremento en los niveles de c-MYC fosforilado. Este resultado concuerda con el efecto de las sales biliares sobre c-MYC, ya que son responsables de activar c-MYC via ERK1/2; además, la inactivación de ERK con inhibidores específicos disminuye la unión de c-MYC a ADN [Yang H. *et al.*, 2008]. La activación de c-MYC puede promover dos respuestas opuestas, tales como la proliferación celular y la apoptosis [Pelengaris S, *et al.*, 2000]. La respuesta proliferativa de c-MYC es dependiente de la transcripción de genes implicados en la maquinaria de síntesis proteica, y por tanto afecta a los ribosomas [Poortinga G. *et al.*, 2004]. Por lo tanto, en el hígado cirrótico se observa la activación de ERK1/2 y de c-MYC, responsables de la proliferación celular.

Las proteínas de la familia MAD están implicadas en la regulación del crecimiento y de la división celular. MAD-1 tiene función antagonista a MYC; su sobreexpresión reduce la expresión de un grupo de moléculas implicadas en la biogénesis ribosomal y la traducción a proteína [Iritani B.M. *et al.*, 2002]. MAD-1 además regula negativamente el crecimiento celular y la transcripción del ADN de granulocitos en diferenciación [Poortinga G. *et al.*, 2004]. En nuestro modelo de cirrosis experimental, se observó una marcada disminución del nivel de proteína MAD-1. En extractos citoplasmáticos de hígado se encontraron niveles mayores de MAD-1

en el grupo BDL que en el grupo SHAM y PAIR-FED. En granulocitos en diferenciación la delección del gen de MAD-1 induce un incremento de la síntesis proteica y del volumen celular [Poortinga G. *et al.*, 2004]. El incremento de MAD-1 en hígado cirrótico de 28 días parece indicar una disminución de la actividad proliferativa hepática, o al menos la activación de una respuesta antiproliferativa. Sin embargo, en muestras de hígado de pacientes con cáncer hepático los resultados son contradictorios, ya que MAD-1 puede estar incrementado [Sze K.M., *et al.*, 2008] o disminuido [Nam C.W. *et al.*, 2008] en el tejido tumoral comparado con el tejido sano. Por lo tanto, otros factores tiene que estar implicados en la regulación de MAD-1 a nivel de proteína, y uno de ellos puede ser el estrés oxidativo [Pizzimenti S. *et al.*, 2006].

El oncogén c-MYC es el regulador universal de la proliferación celular, ya que dirige la transcripción de las polimerasas I, II y III [Oskarsson T., Trumpp A., 2005]. Está sobreexpresado en el carcinoma hepatocelular [Ohgaki H. *et al.*, 1996; Feitelson M.A. *et al.*, 2004] y en la cirrosis biliar [Rodríguez J.L. *et al.*, 2006], que es considerada como una alteración pre-neoplásica [Yasui H. *et al.*, 1992; Findor J. *et al.*, 2002]. Nuestros experimentos muestran un incremento de los niveles de la forma fosforilada – activa – de c-MYC en el hígado cirrótico; este resultado concuerda con la mayor capacidad de unión de c-MYC al ADN en el hígado BDL [Yang H. *et al.*, 2008]. Para determinar si c-MYC está activo en el hígado cirrótico, se determinó la expresión de uno de sus genes diana: el factor de unión a ADN UBF, responsable de la transcripción del ADNr. UBF se incrementa en el hígado cirrótico a nivel de ARNm y de proteína.

ERK promueve la progresión en el ciclo celular regulando el estado de fosforilación de pRB, un potente inhibidor del crecimiento celular y de la proliferación [White R.J., 2005; Voss M. *et al.*, 1999]. Nuestros resultados muestran niveles bajos de pRB en hígado control, que es compatible con la escasa actividad proliferativa del hígado sano. Sin embargo, en el hígado cirrótico la forma madura de pRB está ausente, estando muy incrementada una forma de menor tamaño. Está descrito que la degradación de pRB es dependiente del daño al ADN y de activación de FAS [Dou Q.P. *et al.*, 1997; Diederich L. *et al.*, 1998], características conocidas del hígado BDL [Miyoshi H. *et al.*, 1999; Tieppo J. *et al.*, 2007]. De esta forma, en el hígado BDL se pierde uno de los principales mecanismos de inhibición para frenar el crecimiento del órgano.

ERK está implicada en la respuesta proliferativa del hígado cirrótico, actuando sobre c-MYC y UBF. UBF es una proteína de unión al ADNr y promueve la transcripción de genes ribosomales [Kopp K. *et al.*, 2007]. La quinasa ERK1/2 está implicada en la modificación post-traducciona de UBF, regulando su unión al ADNr [Stefanovsky V.Y. *et al.*, 2001]. La quinasa ERK1/2 está incrementada a nivel proteico y está fosforilada en los hígados cirróticos. Hasta la fecha hay controversias sobre el papel de UBF en la regulación de la transcripción. Sin embargo, los últimos estudios sugieren que UBF es regulador positivo de la transcripción, concretamente de la transición entre la iniciación y la elongación [Panov K.I. *et al.*, 2006]. Nuestros resultados muestran que el hígado cirrótico tiene activos los mecanismos clave mediados por ERK1/2 y c-MYC sobre el control de la proliferación y crecimiento celular.

La correcta inducción de la biogénesis ribosomal necesita la acción coordinada de las polimerasas I, II y III, el mecanismo de transporte del ADNr, y de proteínas implicadas en la traducción del ARNm. Un desequilibrio entre las distintas formas de 28S, 18S, 5,8S, 5S y ARNt ocasiona una pérdida de funcionalidad de los ribosomas [Michels AA., Hernandez N., 2006]. En el hígado cirrótico se observa una distribución normal de las distintas especies de ARNr, medido por cromatografía capilar. Esto supone que la elevada proliferación hepática en el hígado cirrótico parece promover la síntesis de ribosomas funcionales. Por ello, se midieron también los niveles de *eif6/p27bbp*, una proteína encargada del procesamiento del 35S ribosomal en levadura [Basu U. *et al.*, 2001], y que es un regulador del ensamblaje de los ribosomas en células eucariotas [Sanvito F *et al.*, 1999]. Eif6/p27BBP está presente normalmente en células humanas en el citoplasma y en el núcleo, pero está incrementada en tejidos tumorales. En el hígado BDL se observa un incremento del ARNm de *eif6/p27bbp*, coherente con la mayor necesidad de procesamiento del ARNr y una incrementada biogénesis ribosomal.

En el hígado cirrótico se evidencia un incremento de los ARNm de las proteínas ribosomales *rplp0*, *rpl30*, *rpl32* y *rps16*. En un estudio de *clustering* de promotores de los 79 genes ribosomales humanos, se identificaron GC-box y secuencias de reconocimiento para NRF-2, YY-1, y AP-1 [Ishii K. *et al.*, 2006]. Los 4 genes ribosomales estudiados tienen un perfil de expresión similar, y probablemente estén regulados por un único mecanismo. Quizás éste sería el caso de AP-1, el único factor de transcripción que tiene sitio de reconocimiento en los 4 promotores. Esta hipótesis es coherente

con el incremento de la actividad de unión al ADN de AP-1, que se ha encontrado a los 10 días post-ligadura del ducto biliar [Bird M.A. *et al.*, 2002].

En el hígado BDL se observa sobreexpresión de *fbl*, gen implicado en el procesamiento del pre-ARNr. El silenciamiento de *fbl* afecta negativamente la morfología nuclear y frena el crecimiento celular [Amin M.A. *et al.*, 2007]. Es por lo tanto considerada una proteína fundamental en el desarrollo y en la proliferación. Paralelamente en el hígado cirrótico se verifica un incremento de la expresión de *b23*, que también codifica para una proteína esencial para el desarrollo y el crecimiento celular. Este resultado está de acuerdo con la activación de c-MYC en el hígado cirrótico, ya que tiene un sitio de unión de unión en el promotor de *b23* [Yung B.Y.M., 2004]. Un estudio reciente muestra que B23 está implicada en el *export* nuclear de las subunidades ribosomales 40S y 60S, de manera que la expresión de una B23 defectuosa está relacionada con una menor disponibilidad de polisomas funcionales en el citoplasma [Maggi L.B, Jr, *et al.*, 2008]. A la luz de estos resultados, se confirma que en el hígado cirrótico se produce una coordinada e intensa estimulación de la biogénesis ribosomal a múltiples niveles - transcripción, procesamiento y transporte - para facilitar la síntesis proteica requerida en la importante proliferación celular del hígado cirrótico.

Mecanismos compensatorios que contrarrestan la proliferación celular están activos en el hígado cirrótico. Resultados de otros estudios muestran que el hígado BDL sufre una importante

oxidación en el ADN [Kitada T. *et al.*, 2001] y el desencadenamiento de la apoptosis. Asimismo, en el hígado BDL se observa una marcada fosforilación de p53, implicada en la respuesta a estrés genotóxico y promotora de la apoptosis. Este hallazgo es confirmado por el incremento de P53 en hígado BDL de ratón, paralelamente al incremento de c-MYC [Yang H. *et al.*, 2008]. Uno de los genes diana de P53 es *p21*, implicado en el arresto del ciclo celular y promotor de la apoptosis [el-Deiry W.S. *et al.*, 1994]. En nuestro estudio observamos un incremento de aproximadamente 2 veces en *p21* en el hígado BDL, de acuerdo a otros resultados en rata BDL [Biecker E. *et al.*, 2005]. En un estudio anterior, mostramos por citometría de flujo una marcada apoptosis en hepatocitos de hígado cirrótico [Serviddio G. *et al.*, 2004]. Por ello, la activación de la vía p53/p21 observado en el presente estudio, es probablemente el último recurso de la célula para eliminar células inevitablemente dañadas y con alto riesgo de mutaciones en el ADN.

En el hígado cirrótico se observa un marcado incremento de la biogénesis ribosomal, que favorece el rápido crecimiento hepático, contrarrestado por la inducción de genes pro-apoptóticos. La activación de vías proapoptóticas parece esencial para eliminar células con daño al ADN, con alto riesgo de mutaciones.

CONCLUSIONES

Capítulo Sexto

En el estudio de la biogénesis mitocondrial en la cirrosis biliar, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. En el hígado cirrótico se observa una alteración de la regulación de la biogénesis mitocondrial a nivel nuclear. PGC-1 α disminuye a nivel de ARNm y de proteína, GABP- α disminuye a nivel de proteína, y NRF-1 está fosforilado pero aparentemente inactivo.
2. En el hígado cirrótico disminuye el nivel de pre-proteína de TFAM, responsable de la transcripción y el mantenimiento del ADN mitocondrial. Asimismo, los niveles de la forma madura de TFAM no son detectable en el hígado cirrótico.
3. En el hígado cirrótico se mantiene el *import* de VDAC/Porina1, proteína de la membrana mitocondrial externa. Asimismo, en el hígado cirrótico se observa un fallo en el *import* de algunas proteínas de la matriz mitocondrial, tales como TFAM, mtHSP70 y HSP60, con importantes implicaciones sobre el mantenimiento del ADNmt y la función mitocondrial.
4. En el hígado cirrótico se observa una disminución de la densidad mitocondrial y una disminución del cociente ADNmt/ADNn, que puede explicarse por la pérdida de TFAM en la mitocondria.

En el estudio de la biogénesis ribosomal en la cirrosis biliar, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

5. En la cirrosis biliar, la hepatomegalia y el incremento de la síntesis de ADN, se asocian con una activación de las señales de proliferación celular - fosforilación de ERK1/2 y fosforilación de c-MYC - y una pérdida de un importante mecanismo de inhibición de la proliferación - degradación de pRB -.
6. La fosforilación de c-MYC promueve la biogénesis ribosomal por incremento de UBF, regulador de la actividad de la ARN POL-I. Además, en el hígado cirrótico está incrementada la expresión de genes implicados en la síntesis de ribosomas, en su translocación y en la traducción de proteínas.
7. En el hígado cirrótico se promueve la apoptosis por la activación de p53 y la inducción de p21. Estas señales tienen importante implicación como defensa frente a la transformación celular.

DISCUSSION

Chapter Seven

7.1.MITOCHONDRIAL BIOGENESIS IN SECONDARY BILIARY CIRRHOSIS

Cholestasis causes accumulation of toxic bile acids in the liver and promotes severe mitochondrial dysfunction in rodents and in humans [Vendemiale G. *et al.*, 2002; Serviddio G. *et al.*, 2004]. Krähebühl and colleagues found that absolute liver mitochondrial protein content increases but fractional content (liver mitochondrial density) decreases in long-term BDL rats [Forestier M. *et al.*, 1997]. These results suggested a decreased mitochondrial biogenesis (synthesis of new mitochondria and regeneration of damaged mitochondria). Mitochondrial impairment in infants with cholestasis is associated with liver mtDNA depletion and fibrosis [Ducluzeau P.H. *et al.*, 1999; Dimmick J., 2004]. mtDNA depletion is also reported in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) [Yin P.H. *et al.*, 2004], which can eventually develop at later stages of chronic cholestasis [McGill J.M., Kwiatkowski A.P., 1998]. Our study in rats with long-term extrahepatic cholestasis confirms the decrease in mitochondrial protein content per gram of liver, as previously observed by others [Forestier M. *et al.*, 1997], and explains the mechanism that leads to a decreased mitochondrial biogenesis.

NRF-1 and GABP- α are key transcriptional activators of nuclear genes encoding mitochondrial proteins, such as cytochrome *c* (*cycs*) [Evans M.J., Scarpulla R.C., 1989], 5-aminolevulinate synthase (*alas-1*) [Braidotti G *et al.*, 1993], and all ten nuclear-encoded

subunits of cytochrome c oxidase [Dhar S.S. *et al.*, 2008], among others. They cooperatively activate transcription by the TFAM promoter [Virbasius J.V., Scarpulla R.C., 1994], key regulator of mtDNA transcription and replication [Virbasius J.V., Scarpulla R.C., 1994; Choi Y.S. *et al.*, 2002]. In this study, cholestatic livers had total NRF-1 protein levels (68 + 70 kDa proteins) comparable to those found in SHAM, but a complete post-transcriptional modification of NRF-1 was evident only in BDL samples, as the protein migrated at a higher molecular weight than the expected 68 kDa. The net mass change (~2 kDa) is compatible with protein phosphorylation, previously described by others to occur during oxidative cellular damage [Piantadosi C.A., Suliman H.B., 2006] or increased energy demand (assessed as a decreased ATP/ADP ratio) [Bergeron R. *et al.*, 2001]. It has been reported that BDL livers have a decreased GSH and increased GSSG content, representative of oxidative stress [Alptekin N. *et al.*, 1997; Huang Y.T. *et al.*, 2003; Serviddio G. *et al.*, 2004]. NRF-1 phosphorylation and translocation to the nucleus occurs under *tert*-butyl-hydroperoxide treatment in hepatoma cells, by a mechanism phospho-AKT(S473) dependent [Piantadosi C.A., Suliman H.B., 2006].

Our results show a complete translocation of NRF-1 into the nucleus in BDL samples, but not in SHAM. Nonetheless, no increase in the phosphorylation level of p-AKT(S473) was observed in BDL livers, indicating that this kinase is not a likely candidate for NRF-1 phosphorylation and translocation to the nucleus in BDL rats. In the white quadriceps muscle, an increased phosphorylation of AMPK, a sensor of the energy state of the cell [reviewed in Hardie D.G., Carling

D., 1997], promotes NRF-1 phosphorylation and DNA binding [Bergeron R. *et al.*, 2001]. BDL rats exhibit energy production deficiency because of largely impaired oxidative phosphorylation [Krähenbühl L. *et al.*, 1998], fatty acid oxidation [Krähenbühl S. *et al.*, 1994; Lang C. *et al.*, 2001], and production of ketone bodies [Lang C. *et al.*, 2002]. Accordingly, we observed a complete phosphorylation of AMPK in the liver of BDL rats. Nevertheless, a higher protein level of p-AMPK was found in SHAM livers, which did not show as high NRF-1 phosphorylation and nuclear translocation as observed in BDL samples. NRF-1 can also be phosphorylated and transcriptionally inactivated at TFAM promoter via cyclin D1 interaction; the latter is itself phosphorylated by CDK-4 [Wang C. *et al.*, 2006]. In this study, we found a 7 fold increase in CDK-4 just in BDL liver, which could so inhibit NRF-1 function. Taken together, these results show that NRF-1 phosphorylation is not due to canonical activatory mechanisms, supporting the idea of an inhibitory phosphorylation.

Nuclear control of mitochondrial biogenesis is disregulated in BDL rats. *tfam* rat promoter activity is regulated by trans-acting elements NRF-1, GABP- α , and SP-1 [Choi Y.S. *et al.*, 2002]. Deletion of either GABP- α or NRF-1 binding sites accounts for a 50 % decrease in luciferase activity, being this decrease just 10 % for SP-1. In addition, PGC-1 α can double *tfam* promoter transcription in this system [Wu Z. *et al.*, 1999]. Thus, in this study we analyzed the protein level of GABP- α , NRF-1 and PGC-1 α and assessed the levels of *tfam* transcript and protein. GABP- α was largely decreased in BDL rats, and NRF-1 phosphorylated in the nucleus. NRF-1 and GABP- α share common functions concerning the regulation of mitochondrial

biogenesis [Gleyzer N. *et al*, 2005; and reviewed in Scarpulla R.C., 2006], but independently regulate apoptosis [Morrish F. *et al*, 2003] and cell cycle progression [Yang Z.F. *et al*, 2007]. Phosphorylation of NRF-1 can enhance [Gugneja S., Scarpulla R.C., 1997] or repress *tfam* transcription [Wang C. *et al*, 2006] and its DNA binding properties. In this study, *tfam* transcript level is not decreased in BDL liver compared to PAIR-FED, despite a different GABP- α levels and a NRF-1 post-transcriptional modification. This supports a different, but equally efficient, regulation of mitochondrial biogenesis in BDL liver.

In order to confirm that a normal regulation of mitochondrial biogenesis at nuclear level is present in the cholestatic liver, we also measured the mRNA levels of *cycs*, *pol- γ* , *atp-5i* and *atp-5b*. A dual response was observed: *atp-5i* and *pol- γ* were sensitive to a decreased calorie intake, but *atp-5b* and *cycs* were not. *cycs* promoter is activated by NRF-1 [Evans M.J., Scarpulla R.C., 1989], but other factors contribute to its regulation, such as CREB [Herzig R.P. *et al*, 2000], and PGC-1 α [Vercauteren K. *et al*, 2006]. NRF-1 translocation to the nucleus of BDL livers did not lead to an increase in *cycs* transcript level. This is in accordance with the hypothesis that NRF-1 is phosphorylated but transcriptionally inactive, or suggests a negative co-regulation by PGC-1 α . PGC-1 α could be in fact decreased in BDL livers to down-regulate bile acid synthesis [Shin D.J. *et al*, 2003], the major source of hepatotoxicity [Krähenbühl S. *et al*, 1994; Jaeschke H. *et al*, 2002]. Nonetheless, BDL transcript levels of *atp-5i*, *pol- γ* , *atp-5b*, *cycs*, and *tfam* did not vary with respect to PAIR-FED levels. No specific response-cholestasis dependent was observed in the BDL group alone. Taken together, these results show that the

expression of nuclear transcripts for mitochondrial proteins is finely regulated and it is not restrained in the cholestatic liver; this occurs despite changes in the expression of the key transcription factors involved in the process, NRF-1 and GABP- α .

Import failure of mitochondrial matrix-targeted proteins TFAM and mtHSP70 in cholestatic liver. Since an apparent normal response in mitochondrial biogenesis occurs at the nuclear level, why there are less mitochondria in the liver of cirrhotic rats and they are not are not producing enough energy and are generating more free radicals? To address this question we studied the mitochondrial biogenesis downstream of its nuclear regulation. Immunoblotting experiments evidenced a significant decrease in TFAM pre-protein in BDL with respect to PAIR-FED livers. As other mitochondrial pre-proteins, TFAM (29 kDa) is imported into the mitochondrion upon cleavage of a C-terminal sequence [Garstka H.L. *et al.*, 2003], giving a mature form of 25 kDa. Our experiments show a dramatic decrease of the mature TFAM in BDL livers, but not in PAIR-FED ones. The driving force for mitochondrial import of matrix-targeted proteins is the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) and matrix ATP [Krayl M. *et al.*, 2007; Sepuri N.B. *et al.*, 1998a]. Both are decreased in BDL livers at 4 weeks of ligation [Serviddio G. *et al.*, 2004; Tanaka A. *et al.*, 1995; Younes R.N. *et al.*, 2007], suggesting alterations in the import of matrix-directed pre-proteins.

To assess whether the impairment of mitochondrial protein import affects other proteins, we determined the levels of HSP60 and mtHSP70, matrix-targeted proteins responsible for the import and

folding-unfolding of many mitochondrial proteins [Kang P.J. *et al.*, 1990; Mayer A. *et al.*, 1995; Sheffield W.P. *et al.*, 1990]. HSP70 was found remarkably increased (about 4 fold) in BDL in total liver homogenates. Further experiments showed that mtHSP70 was absent from the mitochondrial fraction in the cholestatic liver, being accumulated in the cytosol and other organelles. mtHSP70 has several cellular functions apart from mitochondrial import [Kaul S.C. *et al.*, 2007]. Its extramitochondrial abundance has to be related to its chaperoning activity in other cellular components, involved in protein degradation and in cancer related processes [Walker C. *et al.*, 2006]. Furthermore, its expression is positively regulated by oxidative stress [Yaguchi T. *et al.*, 2007], a well-known feature of the cholestatic liver [Alptekin N. *et al.*, 1997; Ebrahimkhani M.R. *et al.*, 2005; Serviddio G. *et al.*, 2004].

HSP60 (as TFAM and mtHSP70) import is also sensitive to CCCP, a mitochondrial electron chain uncoupler [Huang S. *et al.*, 2002; Singh B. *et al.*, 1990; Singh B. *et al.*, 1997; Gensler S. *et al.*, 2001]. In our study, a minor but significant decrease of HSP60 in BDL compared to PAIR-FED livers was in fact detected. Probably, larger decreases in $\Delta\psi_m$ are needed to impair HSP60 import; alternatively, different TOMM or TIMM may be involved in its import, or compensatory mechanisms could facilitate its import in extrahepatic cholestasis. Clear evidence of a decreased delta psi in hepatic mitochondria of cirrhotic rats has been previously described [Serviddio G. *et al.*, 2004], and a putative role for hydrophobic bile acids has been found in *in vitro* studies [Rolo A.P. *et al.*, 2000]. We

propose that TFAM and mtHSP70 import is in fact inhibited by an important decrease in $\Delta\psi$ found in cholestatic livers.

TOMM70 deficiency and compensatory responses in the TOMM import system in cholestatic rats. To further elucidate the causes of protein import dysfunction into mitochondria, we analyzed the protein level of the 2 receptor-like membrane proteins, TOMM20 and TOMM70, and the major import pore protein TOMM40 in the mitochondrial fraction. TOMM70 was dramatically decreased with respect to SHAM in BDL livers, but not in PAIR-FED. As previously proposed by others, compensatory mechanisms may act to maintain protein import in mitochondria [Joseph A.M. *et al.*, 2004]. In this study we observed a minor but not significant increase in TOMM20 at the protein level in the mitochondrial fraction, accompanied by a post-transcriptional modification not previously identified in other studies. TOMM40, conversely, was highly increased in BDL mitochondria with respect to SHAM and PAIR-FED.

This cross-regulation of TOMM proteins is probably necessary to maintain the import of some mitochondrial proteins. In fact VDAC1, which is imported via TOMM20 and TOMM40 [Krimmer T. *et al.*, 2001], was increased ~2 fold in total liver homogenate in BDL, and confirmed in mitochondrial preparations. The importance of this finding goes beyond the sole functionality of the TOMM complex. In fact, VDAC1 is also involved in metabolite [Rostovtseva T.K., Bezrukov S.M., 1998] and protein import across the external mitochondrial membrane when some TOMM proteins are lacking [Krimmer T. *et al.*, 2001]. This is probably the case in BDL rats, which

have a decreased protein import and a dramatic decrease in TOMM70.

Taken together, these results show that compensatory mechanisms – altered TOMM composition - are not sufficient to offset the decrease of some matrix-directed proteins in BDL rats. These adaptations are also known to occur also in Rho(-) cells, which exhibit a reduced mtDNA content [Joseph A.M. *et al.*, 2004].

Mitochondrial liver fraction and mtDNA content decrease in the cholestatic liver. To assess the impact on mitochondrial biogenesis of a defective import of mtHSP70 and TFAM in BDL liver, we determined the mitochondrial-to-total-liver protein fraction in the 3 groups of animals. Our results show that BDL livers have 50% less mitochondria than SHAM livers per gram of tissue. Conversely, PAIR-FED animals had 20% more mitochondrial mass per gram of liver tissue. This suggests that 20% calorie restriction alone can boost mitochondrial biogenesis in the liver, which is largely dependent on TFAM and mtHSP70 import. Previous studies, where a more aggressive calorie restriction protocol was used, also demonstrated a direct stimulatory effect of calorie restriction on mitochondrial biogenesis [Nisoli E. *et al.*, 2003; Civitarese A.E. *et al.*, 2007]. Further evidence for an impaired mitochondrial biogenesis in cholestatic livers is supported by a 60% decrease in mtDNA/nDNA ratio found in BDL liver. A decreased mtDNA copy number per mitochondria was also found in HCC patients [Yin P.H. *et al.*, 2004], and a higher copy number of nDNA in cholestatic livers. Again, livers of PAIR-FED rats had an increased mtDNA/nDNA over SHAM

animals, showing that a disease specific defect in mtDNA synthesis occurs in BDL livers. TFAM, responsible for the maintenance of mtDNA copy number, is largely decreased in BDL rats. Putative decrease in $\Delta\psi_m$ by bile acids accumulation is likely responsible for a defective import of TFAM and mtHSP70, which in turn results in a decreased mtDNA/nDNA ratio. Compensatory mechanisms to increase protein import, as an increased TOMM40 abundance in the mitochondria, – are sufficient to maintain the import of some mitochondrial proteins, as VDAC1. Nonetheless, they are not sufficient for the maintenance of mtDNA mass in the cholestatic liver. Thus, we propose that a decreased import of TFAM and mtHSP70 are responsible for the reduced mitochondrial biogenesis, contributing to the loss of function found in cholestatic livers in BDL rats.

7.2.LIVER PROLIFERATION AND RIBOSOME BIOGENESIS IN BILIARY CIRRHOSIS

During cholestasis, liver cells become highly proliferative [Georgiev P. *et al.*, 2008]. In this study we observed that liver growthed by 25 % in a week. Cholangiocytes, hepatic stellate cells, and to a minor extent hepatocytes respond to variety of proliferative stimuli, among them nerve growth factor (NGF) [Gigliozzi A. *et al.*, 2004], hepatocyte growth factor (HGF) [Purps O. *et al.*, 2007], platelet derived growth factor (PDGF) [Borkham-Kamphorst E. *et al.*, 2008], and bile acids (BA) [Drudi Metalli V. *et al.*, 2007].

Normal liver is poorly proliferative, but re-enters the cell cycle and starts regenerating under different conditions [Brenner D.A. *et al.*, 1998]. In the cirrhotic liver we observed a 6-fold increase in CDK-4, a key protein involved in G₁ to S phase transition. In agreement with previous findings in BDL liver, we observed a 30-fold increase in PCNA [Lunz JG 3rd. *et al.*, 2005]. Those events are tightly coupled to the increased DNA content found in the cholestatic liver.

Moderate oxidative stress promotes proliferation, being high H₂O₂ concentrations toxic to the cell [Davies K.J., 1999]. In this study, we found that chronic liver cholestasis is associated with an increased phosphorylation of p38 and ERK1/2. Both kinases are responsive to an oxidising environment [Gigliozzi A. *et al.*, 2004; Svegliati-Baroni G. *et al.*, 2003]. In particular, ERK1/2 can be phosphorylated by H₂O₂-dependent mechanisms [Benassi B. *et al.*, 2006], and is also active during nitrosative stress [Iwagaki A. *et al.*, 2003]. In this study, we observed a marked increase in protein nitration levels in BDL liver, as assessed by nitrotyrosine immunoblotting. This result is consistent with studies involving patients with chronic colestasis [Vendemiale G. *et al.*, 2002], and cholestatic rats [Serviddio G. *et al.*, 2004]. Both studies show a decreased liver GSH content (a free radical scavenger) and an increased malonyldialdehyde (MDA) level. Thus, we suggest that oxidative and nitrosative stress in the cholestatic liver is possibly responsible for ERK1/2 phosphorylation.

ERK1/2 kinases are involved in cell growth and proliferation; not surprisingly, it is active in ~30 % of human tumors [Taniguchi F.

et al., 2003]. In this study ERK1/2 was found increased and phosphorylated in the cholestatic liver. ERK1/2 is responsible for c-MYC phosphorylation and activation, and inhibition of ERK1/2 activation decreases c-MYC DNA-binding [Yang H. *et al.*, 2008]. Consistent with our hypothesis, we observed a 2-fold increase in c-MYC phosphorylation. c-MYC activation is responsible for opposite responses, such as cell proliferation and apoptosis [Pelengaris S., *et al.*, 2000]. Proliferation under the control of c-MYC promotes up-regulation of transcriptional regulators and translation machinery to drive protein synthesis *via* ribosome biogenesis [Poortinga G. *et al.*, 2004]. Accordingly, in the cirrotic liver c-MYC is phosphorylated and associated with ERK1/2 activation.

The MYC/MAX/MAD protein family is responsible for cell growth and proliferation [Ayer D.E. *et al.*, 1993]. MAD-family proteins are antagonically linked to c-MYC; its overexpression decreases ribosome biogenesis and protein translation [Iritani B.M. *et al.*, 2002]. MAD-1 also negatively regulates cell growth and rDNA transcription in granulocytes during differentiation [Poortinga G. *et al.*, 2004]. In this study we found an important increase in MAD-1 protein level in the cirrhotic liver. This result can possibly imply an anti-proliferative response to decrease the risk of cell mutation and cancer development. A previous study showed that *mad-1* deletion in differentiated granulocytes induces an increase in protein synthesis and cell volume [Poortinga G. *et al.*, 2004]. Consequently, an increase in MAD-1, negative transcriptional regulator, could work to reduce cell growth and ribosome biogenesis in the cholestatic liver. Nevertheless, its role in liver cancer development is controversial. In

fact, MAD-1 was found increased [Sze K.M., *et al.*, 2008], and decreased [Nam C.W. *et al.*, 2008] in tumors compared to non-tumors of HCC patients. So, it seems that MAD-1 regulation is under the control of different, yet not fully elucidated, mechanisms.

The oncogene c-MYC is a master regulator of cell growth and proliferation, as it promotes transcription by the three RNA polymerases [Oskarsson T., Trumpp A., 2005]. c-MYC mRNA and protein are overexpressed in hepatocellular carcinoma [Ohgaki H. *et al.*, 1996; Feitelson M.A. *et al.*, 2004] and in biliary cirrhosis [Rodríguez J.L. *et al.*, 2006], which is considered a pre-neoplastic alteration [Yasui H. *et al.*, 1992; Findor J. *et al.*, 2002]. In our experiments, we observed a 2-fold increase in c-MYC phosphorylation in the cirrhotic liver. This result agrees with an increased c-MYC-DNA binding capacity in the cirrhotic liver, found by others [Yang H. *et al.*, 2008]. c-MYC transcriptional control is also achieved by up-regulation of its target gene *ubf-1*, responsible for rDNA transcription. We found that *ubf-1* and its product UBF are increased, showing a c-MYC positive regulation of transcription in the cholestatic liver.

ERK promotes cell cycle progression by inducing pRB phosphorylation, a potent inhibitor of cell growth and proliferation [White R.J., 2005; Voss M. *et al.*, 1999]. Our results show low pRB abundance in control liver, consistent with poor liver proliferation in healthy liver. Nevertheless, the mature form of pRB was not detected in cirrhotic livers. It was described that pRB degradation is dependent on DNA damage and FAS activation [Dou Q.P. *et al.*, 1997;

Diederich L. *et al.*, 1998], and both of them are known characteristics of BDL liver [Miyoshi H. *et al.*, 1999; Tieppo J. *et al.*, 2007]. Thus, the cirrhotic liver loses one of the main cell growth and proliferation inhibitory mechanisms.

The ERK-c-MYC-UBF axis is active in the cirrhotic liver. UBF is an rDNA binding protein, involved in ribosomal gene transcription [Kopp K. *et al.*, 2007]. ERK1/2 kinases are responsible for post-translational modification of UBF, thus regulating its rDNA binding activity [Stefanovsky V.Y. *et al.*, 2001]. ERK1/2 was phosphorylated in the cirrhotic liver, with possible implications on UBF activation. So far, controversy still exists on the precise role of UBF in promoting transcription, but it is known to have a role in the transition between initiation and elongation [Panov K.I. *et al.*, 2006]. Our results suggest that UBF is active in the proliferating cirrhotic liver.

A proper ribosome biogenesis needs transcriptional up-regulation by the three polymerases. A disbalance between rRNA isoforms is related to a decreased ribosomal function [Michels AA., Hernandez N., 2006]. In the cirrhotic liver we found a normal distribution of rRNA species, as measured by capillary chromatography. rRNA maturation and ribosomal protein transport and assembly are under the control of a variety of proteins. To determine whether a normal pattern of ribosome biogenesis in the cirrhotic liver was occurring, we measured transcript levels of putative genes involved in ribosome biogenesis by qPCR. In the cirrhotic liver we found a ~2-fold increase in *eif6/p27bbp* mRNA, which codes for a protein responsible for 35S rRNA processing in

yeast [Basu U. *et al.*, 2001], and responsible for ribosome assembly in eukaryotic cells [Sanvito F *et al.*, 1999]. Previous studies show that EIF6/p27BBP is increased in tumor samples, a model of high proliferative capacity. Therefore, the increase in *eif6/p27bbp* in cirrhotic liver is consistent with the increased rRNA synthesis and ribosome biogenesis.

To further assess ribosome biogenesis in chronic cholestasis, we measured *fbl* and *b23* expression by qPCR. In the cholestatic liver, we observed a ~2-fold increase in *fbl* mRNA, whose protein is responsible for pre-rRNA processing. A previous study demonstrated that *fbl* silencing negatively affects nuclear morphology and slows cell growth, implying an important role of *fbl* in development and proliferation [Amin M.A. *et al.*, 2007]. Our experiments also show an increase in *b23* at the transcript level in cholestatic liver. B23, an essential protein in development and cell growth, is regulated at the promoter level by c-MYC [Yung B.Y.M., 2004]. This is consistent with c-MYC activation found in the cirrhotic liver. A recent study shows that B23 is involved in 40S and 60S nuclear *export*. In fact, a defective *b23* expression is related to a poor availability of functional cytoplasmic polysomes [Maggi L.B, Jr, *et al.*, 2008]. Consequently, these results are consistent with an increased rRNA processing and transport, with an important relevance for ribosome biogenesis.

Ribosome biogenesis is dependent on up-regulation of ribosomal protein transcription. Our results show an increased level of *rplp0*, *rpl30*, *rpl32* y *rps16* ribosomal protein transcripts. In a recent study on promoter clustering of human ribosomal genes, GC-

boxes and recognition sites for NRF-2, YY-1, and AP-1 were identified [Ishii K. *et al.*, 2006]. All ribosomal proteins analysed in this study have a similar expression pattern, suggesting the existence of a similar control mechanism. AP-1 is the only transcription factor to have a (theoretical) binding site in the 4 promoters. The possibility of AP-1 as another transcriptional regulator of ribosomal protein expression is consistent with an increased AP-1-DNA binding 10 days after bile duct ligation [Bird M.A. *et al.*, 2002]. Taken together, these results show a coordinate up-regulation of ribosome biogenesis at multiple levels in the cholestatic liver. The increase in ribosomal protein expression, rRNA processing, and transport evidences a pattern of protein synthesis and cell proliferation in the cirrhotic liver.

Important compensatory mechanisms are active in the cirrhotic liver. Previous studies show DNA oxidation [Kitada T. *et al.*, 2001] and apoptosis in the cholestatic liver [Miyoshi H. *et al.*, 1999]. Consistently, in the same model we have observed a marked p53 phosphorylation, a protein responsive to genotoxic stress [Hainaut P. 1995] and involved in apoptosis [el-Deiry W.S. *et al.*, 1994]. This result is in line with a p53 increase in the BDL model in mice [Yang H. *et al.*, 2008]. p53 regulates cell cycle arrest and apoptosis by up-regulation of *p21* promoter [el-Deiry W.S. *et al.*, 1994]. In our study, we observed a ~2 fold increase in p21 in cholestatic liver, in accordance with previous results by others [Biecker E. *et al.*, 2005]. We previously described an important apoptosis in cirrhotic hepatocytes [Serviddio G. *et al.*, 2004], consistent with the activation of the p53/p21 pathway in the cirrhotic liver. Thus, we propose that

p53 mediated apoptosis is *per se* causing a functional loss in the cholestatic liver, but also responding to an abrupt proliferative response of liver cells, persistent after 4 weeks of bile duct ligation. This mechanism may be active to respond to DNA-damaged liver cells, at high risk of transformation.

CONCLUSIONS

Chapter Eight

In the study of mitochondrial biogenesis in biliary cirrhosis we reached the following conclusions:

1. Cirrhotic liver is characterized by mitochondrial biogenesis alterations at nuclear level. PGC-1 α decreases at transcript and protein level, paralleled by a GABP- α decrease at protein level. NRF-1 is highly phosphorylated but inactive in the cirrhotic liver.
2. TFAM pre-protein level is decreased in cirrhotic liver. Anyway, mature form of TFAM (mitochondrial protein) is not detectable in the cirrhotic liver.
3. A distinctive regulation of mitochondrial protein import characterizes cirrhotic livers. In fact, VDAC1/Porin1 – an outer membrane protein – is efficiently imported into the mitochondria, but TFAM, HSP60 and mtHSP 70 – matrix directed mitochondrial proteins – are not. This has important consequences on mtDNA maintenance and energy production.
4. A decreased mitochondrial density and a decreased mtDNA/nDNA characterizes the cirrhotic liver. This is likely caused by the lack of import of TFAM into the mitochondria.

In the study of ribosome biogenesis in biliary cirrhosis we reached the following conclusions:

5. Secondary biliary cirrhosis is characterized by increased cell proliferation markers and DNA synthesis, promoters of an important hepatomegaly. Proliferative stimuli – ERK1/2 and c-MYC phosphorylation – are active, being inhibitory mechanisms – pRB cleavage – not functional in the cirrhotic liver.
6. c-MYC phosphorylation promotes ribosome biogenesis by UBF transcription, a RNA POL-I regulator. Moreover, protein coding-ribosomal genes and protein involved in rRNA processing and transport are overexpressed in the cirrhotic liver, showing a complex multi-level increase in protein synthesis and cell proliferation.
7. Parallel to abrupt ribosome biogenesis and cell proliferation, mechanisms of apoptosis and cell cycle arrest, dependent on p53 activation, p21 and MAD-1 increase are active in the cirrhotic liver.

BIBLIOGRAFÍA

Capítulo Noveno

1. Akimoto T, Pohnert SC, Li P, Zhang M, Gumbs C, Rosenberg PB, Williams RS, Yan Z. (2005). Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J Biol Chem.* May 20;280(20):19587-93.
2. Alam TI, Kanki T, Muta T, Ukaji K, Abe Y, Nakayama H, Takio K, Hamasaki N, Kang D. (2003). Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic Acids Res.* Mar 15;31(6):1640-5.
3. Albanis E, Friedman SL. (2001). Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis.* May;5(2):315-34, V-VI. Review.
4. Alptekin N, Mehmetçik G, Uysal M, Aykaç-toker G. (1997). Evidence for oxidative stress in the hepatic mitochondria of bile duct ligated rats. *Pharmacol Res.* Sep;36(3):243-7.
5. Amin MA, Matsunaga S, Ma N, Takata H, Yokoyama M, Uchiyama S, Fukui K. (2007). Fibrillarin, a nucleolar protein, is required for normal nuclear morphology and cellular growth in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Aug 24;360(2):320-6.
6. Andersson U, Scarpulla RC. (2001). Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* Jun;21(11):3738-49.
7. Arendt E, Ueberham U, Bittner R, Gebhardt R, Ueberham E. (2005). Enhanced matrix degradation after withdrawal of TGF-beta1 triggers hepatocytes from apoptosis to proliferation and regeneration. *Cell Prolif.* Oct;38(5):287-99.
8. Arthur MJ. (2000). Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Aug;279(2):G245-9. Review.
9. Au HC, Scheffler IE. (1998). Promoter analysis of the human succinate dehydrogenase iron-protein gene—both nuclear respiratory factors NRF-1 and NRF-2 are required. *Eur J Biochem.* Jan 15;251(1-2):164-74.
10. Ayer DE, Kretzner L, Eisenman RN. (1993). Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell.* Jan 29;72(2):211-22.

11. Barón V, Muriel P. (1999). Role of glutathione, lipid peroxidation and antioxidants on acute bile-duct obstruction in the rat. *Biochim Biophys Acta*. Oct 18;1472(1-2):173-80.
12. Basu U, Si K, Warner JR, Maitra U. (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* TIF6 gene encoding translation initiation factor 6 is required for 60S ribosomal subunit biogenesis. *Mol Cell Biol*. Mar;21(5):1453-62.
13. Bataller R, Brenner DA. (2005). Liver fibrosis. *J Clin Invest*. Feb;115(2):209-18. Review.
14. Bataller R, North KE, Brenner DA. (2003). Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. *Hepatology*. Mar;37(3):493-503. Review.
15. Bauer MF, Sirrenberg C, Neupert W, Brunner M. (1996). Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell*. Oct 4;87(1):33-41.
16. Benassi B, Fanciulli M, Fiorentino F, Porrello A, Chiorino G, Loda M, Zupi G, Biroccio A. (2006). c-Myc phosphorylation is required for cellular response to oxidative stress. *Mol Cell*. Feb 17;21(4):509-19.
17. Benson GD, Kikuchi K, Miyakawa H, Tanaka A, Watnik MR, Gershwin ME. (2004). Serial analysis of antimitochondrial antibody in patients with primary biliary cirrhosis. *Clin Dev Immunol*. Jun;11(2):129-33.
18. Bergeron R, Ren JM, Cadman KS, Moore IK, Perret P, Pypaert M, Young LH, Semenkovich CF, Shulman GI. (2001). Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Dec;281(6):E1340-6.
19. Bertwistle D, Sugimoto M, Sherr CJ. (2004). Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Mol Cell Biol*. Feb;24(3):985-96.
20. Biecker E, De Gottardi A, Neef M, Unternährer M, Schneider V, Ledermann M, Sägesser H, Shaw S, Reichen J. (2005). Long-term treatment of bile duct-ligated rats with rapamycin (sirolimus) significantly attenuates liver fibrosis:

- analysis of the underlying mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther.* Jun;313(3):952-61.
21. Bird MA, Lange PA, Schrum LW, Grisham JW, Rippe RA, Behrns KE.(2002). Cholestasis induces murine hepatocyte apoptosis and DNA synthesis with preservation of the immediate-early gene response. *Surgery.* May;131(5):556-63.
 22. Blesa JR, Hegde AA, Hernández-Yago J. (2008). In vitro methylation of nuclear respiratory factor-2 binding sites suppresses the promoter activity of the human TOMM70 gene. *Gene.* Dec 31;427(1-2):58-64.
 23. Blesa JR, Hernández-Yago J. (2006). Distinct functional contributions of 2 GABP-NRF-2 recognition sites within the context of the human TOMM70 promoter. *Biochem Cell Biol.* Oct;84(5):813-22.
 24. Blesa JR, Prieto-Ruiz JA, Hernández JM, Hernández-Yago J. (2007). NRF-2 transcription factor is required for human TOMM20 gene expression. *Gene.* Apr 15;391(1-2):198-208.
 25. Blom J, Kübrich M, Rassow J, Voos W, Dekker PJ, Maarse AC, Meijer M, Pfanner N. (1993). The essential yeast protein MIM44 (encoded by MPI1) is involved in an early step of pre-protein translocation across the mitochondrial inner membrane. *Mol Cell Biol.* Dec;13(12):7364-71.
 26. Bogenhagen DF. (1996). Interaction of mtTFB and mtRNA polymerase at core promoters for transcription of *Xenopus laevis* mtADN. *J Biol Chem.* May 17;271(20):12036-41.
 27. Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Jul;8(7):574-85. Review.
 28. Bolliger L, Junne T, Schatz G, Lithgow T. (1995). Acidic receptor domains on both sides of the outer membrane mediate translocation of precursor proteins into yeast mitochondria. *EMBO J.* Dec 15;14(24):6318-26.
 29. Borkham-Kamphorst E, Kovalenko E, van Roeyen CR, Gassler N, Bomble M, Ostendorf T, Floege J, Gressner AM, Weiskirchen R. (2008). Platelet-derived

- growth factor isoform expression in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury. *Lab Invest.* Oct;88(10):1090-100.
30. Borniquel S, Valle I, Cadenas S, Lamas S, Monsalve M. (2006). Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1 α . *FASEB J.* Sep;20(11):1889-91.
 31. Boya P, Larrea E, Sola I, Majano PL, Jiménez C, Civeira MP, Prieto J. (2001). Nuclear factor-kappa B in the liver of patients with chronic hepatitis C: decreased RelA expression is associated with enhanced fibrosis progression. *Hepatology.* Nov;34(5):1041-8.
 32. Braidotti G, Borthwick IA, May BK. (1993). Identification of regulatory sequences in the gene for 5-aminolevulinate synthase from rat. *J Biol Chem.* Jan 15;268(2):1109-17.
 33. Brenner DA. (1998). Signal transduction during liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol.* Sep;13 Suppl:S93-5. Review.
 34. Brix J, Dietmeier K, Pfanner N. (1997). Differential recognition of pre-proteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. *J Biol Chem.* Aug 15;272(33):20730-5.
 35. Cam H, Balciunaite E, Blais A, Spektor A, Scarpulla RC, Young R, Kluger Y, Dynlacht BD. (2004). A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition. *Mol Cell.* Nov 5;16(3):399-411.
 36. Canbay A, Friedman S, Gores GJ. (2004). Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology.* Feb;39(2):273-8. Review.
 37. Carreras MC, Poderoso JJ. (2007). Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *Am J Physiol Cell Physiol.* May;292(5):C1569-80. Review.
 38. Casini A, Ceni E, Salzano R, Biondi P, Parola M, Galli A, Foschi M, Caligiuri A, Pinzani M, Surrenti C. (1997). Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology.* Feb;25(2):361-7.

39. Castillo G, Brun RP, Rosenfield JK, Hauser S, Park CW, Troy AE, Wright ME, Spiegelman BM. (1999). An adipogenic cofactor bound by the differentiation domain of PPARgamma. *EMBO J.* Jul 1;18(13):3676-87.
40. Chan JY, Kwong M, Lu R, Chang J, Wang B, Yen TS, Kan YW. (1998). Targeted disruption of the ubiquitous CNC-bZIP transcription factor, Nrf-1, results in anemia and embryonic lethality in mice. *EMBO J.* Mar 16;17(6):1779-87.
41. Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA. (2003). Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia.* Jul;17(7):1263-93. Review.
42. Chau CM, Evans MJ, Scarpulla RC. (1992). Nuclear respiratory factor 1 activation sites in genes encoding the gamma-subunit of ATP synthase, eukaryotic initiation factor 2 alpha, and tyrosine aminotransferase. Specific interaction of purified NRF-1 with multiple target genes. *J Biol Chem.* Apr 5;267(10):6999-7006.
43. Chen CH, Nagayama K, Enomoto N, Miyasaka Y, Kurosaki M, Sakamoto N, Maekawa S, Kakinuma S, Ikeda T, Izumi N, Sato C, Watanabe M. (2005). Enhancement of mitochondrial gene expression in the liver of primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res.* Jan;31(1):24-30.
44. Choi YS, Lee HK, Pak YK. (2002). Characterization of the 5'-flanking region of the rat gene for mitochondrial transcription factor A (Tfam). *Biochim Biophys Acta.* Mar 19;1574(2):200-4.
45. Chomczynski P, Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* Apr;162(1):156-9.
46. Chong LW, Hsu YC, Chiu YT, Yang KC, Huang YT. (2006). Anti-fibrotic effects of thalidomide on hepatic stellate cells and dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J Biomed Sci.* May;13(3):403-18.
47. Civitarese AE, Carling S, Heilbronn LK, Hulver MH, Ukropcova B, Deutsch WA, Smith SR, Ravussin E; CALERIE Pennington Team. (2007). Calorie restriction

- increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Med.* Mar;4(3):e76.
48. Clayton DA. (2000). Transcription and replication of mitochondrial ADN. *Hum Reprod.* Jul;15 Suppl 2:11-7. Review.
 49. Cole MD, McMahon SB. (1999). The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene.* May 13;18(19):2916-24. Review.
 50. Dang CV, Resar LM, Emison E, Kim S, Li Q, Prescott JE, Wonsey D, Zeller K. (1999). Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp Cell Res.* Nov 25;253(1):63-77. Review.
 51. Davies K.J. (1999). The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life.* Jul;48(1):41-7. Review.
 52. Davis AF, Ropp PA, Clayton DA, Copeland WC. (1996). Mitochondrial DNA polymerase gamma is expressed and translated in the absence of mitochondrial DNA maintenance and replication. *Nucleic Acids Res.* Jul 15;24(14):2753-9.
 53. de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW, Span PN. (2005). Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest.* Jan;85(1):154-9.
 54. Dekker PJ, Martin F, Maarse AC, Bömer U, Müller H, Guiard B, Meijer M, Rassow J, Pfanner N. (1997). The Tim core complex defines the number of mitochondrial translocation contact sites and can hold arrested pre-proteins in the absence of matrix HSP70-Tim44. *EMBO J.* Sep 1;16(17):5408-19.
 55. Dekker PJ, Ryan MT, Brix J, Müller H, Hönlinger A, Pfanner N. (1998). Pre-protein translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissection and assembly of the general import pore complex. *Mol Cell Biol.* Nov;18(11):6515-24.

56. Deryckere F, Gannon F. (1994). A one-hour miniprep technique for extraction of DNA-binding proteins from animal tissues. *Biotechniques*. Mar;16(3):405.
57. Dhar SS, Ongwijitwat S, Wong-Riley MT. (2008). Nuclear respiratory factor 1 regulates all ten nuclear-encoded subunits of cytochrome c oxidase in neurons. *J Biol Chem*. Feb 8;283(6):3120-9.
58. Di Bacco A, Ouyang J, Lee HY, Catic A, Ploegh H, Gill G. (2006). The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division. *Mol Cell Biol*. Jun;26(12):4489-98.
59. Diederich L, Fotedar A, Fotedar R. (1998). Proteolytic cleavage of retinoblastoma protein upon DNA damage and Fas-mediated apoptosis. *Cell Biol Toxicol*. Mar;14(2):133-40.
60. Dietmeier K, Hönlinger A, Bömer U, Dekker PJ, Eckerskorn C, Lottspeich F, Kübrich M, Pfanner N. (1997). Tom5 functionally links mitochondrial pre-protein receptors to the general import pore. *Nature*. Jul 10;388(6638):195-200.
61. Dimmick J. (2004). Conjugated hyperbilirubinemia in infancy (mitochondrial DNA depletion syndrome, liver). *Pediatr Dev Pathol*. Nov-Dec;7(6):625-8. Epub 2004 Nov 17.
62. Doi R, Inoue K, Kogire M, Sumi S, Takaori K, Suzuki T, Tobe T.(1988). Study on splanchnic circulation: measurement of the liver blood flow. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*. Apr;89(4):560-7. Abstract
63. Dou QP, An B, Antoku K, Johnson DE. (1997). Fas stimulation induces RB dephosphorylation and proteolysis that is blocked by inhibitors of the ICE protease family. *J Cell Biochem*. Mar 15;64(4):586-94.
64. Ducluzeau PH, Lachaux A, Bouvier R, Streichenberger N, Stepien G, Mousson B. (1999). Depletion of mitochondrial DNA associated with infantile cholestasis and progressive liver fibrosis. *J Hepatol*. Jan;30(1):149-55.
65. Ebrahimkhani MR, Sadeghipour H, Dehghani M, Kiani S, Payabvash S, Riazi K, Honar H, Pasalar P, Mirazi N, Amanlou M, Farsam H, Dehpour AR. (2005).

- Homocysteine alterations in experimental cholestasis and its subsequent cirrhosis. *Life Sci.* Apr 8;76(21):2497-512.
66. Eischen CM, Weber JD, Roussel MF, Sherr CJ, Cleveland JL. (1999). Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev.* Oct 15;13(20):2658-69.
67. el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, *et al.* (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* Mar 1;54(5):1169-74.
68. Enseleit F, Hürlimann D, Lüscher TF. (2001). Vascular protective effects of angiotensin converting enzyme inhibitors and their relation to clinical events. *J Cardiovasc Pharmacol.* Apr;37 Suppl 1:S21-30. Review.
69. Evans MJ, Scarpulla RC. (1989). Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *J Biol Chem.* Aug 25;264(24):14361-8.
70. Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A, Trifunovic A, Larsson NG, Gustafsson CM. (2002). Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtADN. *Nat Genet.* Jul;31(3):289-94.
71. Fausto N, Webber EM. (1993). Control of liver growth. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 3(2):117-35. Review.
72. Fausto N. (2000). Liver regeneration. *J Hepatol.* 32(1 Suppl):19-31. Review.
73. Feitelson MA. (2004). c-myc overexpression in hepatocarcinogenesis. *Hum Pathol.* Nov;35(11):1299-302.
74. Ferreira M, Coxito PM, Sardão VA, Palmeira CM, Oliveira PJ. (2005). Bile acids are toxic for isolated cardiac mitochondria: a possible cause for hepatic-derived cardiomyopathies? *Cardiovasc Toxicol.* 5(1):63-73.
75. Findor J, He XS, Sord J, Terg R, Gershwin ME. (2002). Primary biliary cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Autoimmun Rev.* Aug;1(4):220-5. Review.
76. Fontana RJ, Lok AS. (2002). Noninvasive monitoring of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* Nov;36(5 Suppl 1):S57-64. Review.

77. Forestier M, Solioz M, Isbeki F, Talos C, Reichen J, and Krähenbühl, S. (1997). Hepatic mitochondrial proliferation in rats with secondary biliary cirrhosis: time course and mechanisms. *Hepatology* 26:386-391.
78. Fu X, Wan S, Lyu YL, Liu LF, Qi H. (2008). Etoposide induces ATM-dependent mitochondrial biogenesis through AMPK activation. *PLoS ONE*. Apr 23;3(4):e2009.
79. García-Ruiz I, Rodríguez-Juan C, Díaz-Sanjuan T, del Hoyo P, Colina F, Muñoz-Yagüe T, Solís-Herruzo JA. (2006). Uric acid and anti-TNF antibody improve mitochondrial dysfunction in ob/ob mice. *Hepatology*. Sep;44(3):581-91.
80. Garrido N, Griparic L, Jokitalo E, Wartiovaara J, van der Bliet AM, Spelbrink JN. (2003). Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Mol Biol Cell*. Apr;14(4):1583-96.
81. Garstka HL, Schmitt WE, Schultz J, Sogl B, Silakowski B, Pérez-Martos A, Montoya J, Wiesner RJ. (2003). Import of mitochondrial transcription factor A (TFAM) into rat liver mitochondria stimulates transcription of mitochondrial ADN. *Nucleic Acids Res*. Sep 1;31(17):5039-47.
82. Gensler S, Weber K, Schmitt WE, Pérez-Martos A, Enriquez JA, Montoya J, Wiesner RJ. (2001). Mechanism of mammalian mitochondrial DNA replication: import of mitochondrial transcription factor A into isolated mitochondria stimulates 7S DNA synthesis. *Nucleic Acids Res*. Sep 1;29(17):3657-63.
83. Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang JH, Nocito A, Dahm F, Clavien PA. (2008). Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br J Surg*. 2008 May;95(5):646-56.
84. Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene*. Aug;28;25(38):5220-7. Review.
85. Gigliozzi A, Alpini G, Baroni GS, Marucci L, Metalli VD, Glaser SS, Francis H, Mancino MG, Ueno Y, Barbaro B, Benedetti A, Attili AF, Alvaro D. (2004). Nerve growth factor modulates the proliferative capacity of the intrahepatic biliary epithelium in experimental cholestasis. *Gastroenterology*. Oct;127(4):1198-209.

86. Ginès P, Cárdenas A, Arroyo V, Rodés J. (2004). Management of cirrhosis and ascites. *N Engl J Med.* Apr 15;350(16):1646-54. Review.
87. Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC. (2005). Control of mitochondrial transcription specificity factors (*TFBM1* and *TFB2M*) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol.* Feb;25(4):1354-66.
88. Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Romagnoli M, Arduini A, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Viña J. (2008). Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr.* Jan;87(1):142-9.
89. Gómez-Cuadrado A, Martín M, Noël M, Ruiz-Carrillo A. (1995). Initiation binding repressor, a factor that binds to the transcription initiation site of the histone h5 gene, is a glycosylated member of a family of cell growth regulators [corrected]. *Mol Cell Biol.* Dec;15(12):6670-85.
90. Goncalves I, Hermans D, Chretien D, Rustin P, Munnich A, Saudubray JM, Van Hoof F, Reding R, de Ville de Goyet J, Otte JB, et al. (1995). Mitochondrial respiratory chain defect: a new etiology for neonatal cholestasis and early liver insufficiency. *J Hepatol.* Sep;23(3):290-4.
91. Grandori C, Gomez-Roman N, Felton-Edkins ZA, Ngouenet C, Galloway DA, Eisenman RN, White RJ. (2005). c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat Cell Biol.* Mar;7(3):311-8.
92. Grummt I. (2003). Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev.* Jul 15;17(14):1691-702. Review.
93. Gugneja S, Scarpulla RC. (1997). Serine phosphorylation within a concise amino-terminal domain in nuclear respiratory factor 1 enhances DNA binding. *J Biol Chem.* Jul 25;272(30):18732-9.
94. Hachiya N, Komiya T, Alam R, Iwahashi J, Sakaguchi M, Omura T, Mihara K. (1994). MSF, a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria. *EMBO J.* Nov 1;13(21):5146-54.

95. Hainaut P. (1995). The tumor suppressor protein p53: a receptor to genotoxic stress that controls cell growth and survival. *Curr Opin Oncol.* 1995 Jan;7(1):76-82. Review.
96. Hallberg EM, Shu Y, Hallberg RL. (1993). Loss of mitochondrial hsp60 function: nonequivalent effects on matrix-targeted and intermembrane-targeted proteins. *Mol Cell Biol.* May;13(5):3050-7.
97. Handschin C, Lin J, Rhee J, Peyer AK, Chin S, Wu PH, Meyer UA, Spiegelman BM. (2005). Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1 α . *Cell.* Aug 26;122(4):505-15.
98. Hannan KM, Hannan RD, Smith SD, Jefferson LS, Lun M, Rothblum LI. (2000). Rb and p130 regulate RNA polymerase I transcription: Rb disrupts the interaction between UBF and SL-1. *Oncogene.* Oct 12;19(43):4988-99.
99. Hardie DG, Carling D. (1997). The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem.* Jun 1;246(2):259-73. Review.
100. Harkness TA, Nargang FE, van der Klei I, Neupert W, Lill R. (1994). A crucial role of the mitochondrial protein import receptor MOM19 for the biogenesis of mitochondria. *J Cell Biol.* Mar;124(5):637-48.
101. Haucke V, Lithgow T, Rospert S, Hahne K, Schatz G. (1995). The yeast mitochondrial protein import receptor Mas20p binds precursor proteins through electrostatic interaction with the positively charged presequence. *J Biol Chem.* Mar 10;270(10):5565-70.
102. Herath CB, Warner FJ, Lubel JS, Dean RG, Jia Z, Lew RA, Smith AI, Burrell LM, Angus PW. (2007). Up-regulation of hepatic angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and angiotensin-(1-7) levels in experimental biliary fibrosis. *J Hepatol.* Sep;47(3):387-95.
103. Hernandez-Verdun D, Roussel P, Gébrane-Younès J. (2002). Emerging concepts of nucleolar assembly. *J Cell Sci.* Jun 1;115(Pt 11):2265-70. Review.
104. Herzig RP, Scacco S, Scarpulla RC. (2000). Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration

- through the induction of cytochrome c. *J Biol Chem.* Apr 28;275(17):13134-41.
105. Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B, Montminy M. (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature.* Sep 13;413(6852):179-83.
 106. Hill K, Model K, Ryan MT, Dietmeier K, Martin F, Wagner R, Pfanner N. (1998). Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for pre-proteins. *Nature.* Oct 1;395(6701):516-21.
 107. Hirata M, Akbar SM, Horiike N, Onji M. (2001). Noninvasive diagnosis of the degree of hepatic fibrosis using ultrasonography in patients with chronic liver disease due to hepatitis C virus. *Eur J Clin Invest.* Jun;31(6):528-35.
 108. Honar H, Pasalar P, Mirazi N, Amanlou M, Farsam H, Dehpour AR. (2005). Homocysteine alterations in experimental cholestasis and its subsequent cirrhosis. *Life Sci.* Apr 8;76(21):2497-512.
 109. Hönlinger A, Bömer U, Alconada A, Eckerskorn C, Lottspeich F, Dietmeier K, Pfanner N. (1998). Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import. *EMBO J.* May 1;15(9):2125-37.
 110. Hönlinger A, Kübrich M, Moczko M, Gärtner F, Mallet L, Bussereau F, Eckerskorn C, Lottspeich F, Dietmeier K, Jacquet M, *et al.* (1995). The mitochondrial receptor complex: Mom22 is essential for cell viability and directly interacts with pre-proteins. *Mol Cell Biol.* Jun;15(6):3382-9.
 111. Hood DA, Adhihetty PJ, Colavecchia M, Gordon JW, Irrcher I, Joseph AM, Lowe ST, Rungi AA. (2003). Mitochondrial biogenesis and the role of the protein import pathway. *Med Sci Sports Exerc.* Jan;35(1):86-94. Review.
 112. Horst M, Hilfiker-Rothenfluh S, Oppliger W, Schatz G. (1995). Dynamic interaction of the protein translocation systems in the inner and outer membranes of yeast mitochondria. *EMBO J.* May 15;14(10):2293-7.

113. Houten SM, Auwerx J. (2004). PGC-1 α : turbocharging mitochondria. *Cell*. Oct 1;119(1):5-7. Review.
114. Huang S, Ratliff KS, Matouschek A. (2002). Protein unfolding by the mitochondrial membrane potential. *Nat Struct Biol*. Apr;9(4):301-7.
115. Huang YT, Hsu YC, Chen CJ, Liu CT, Wei YH. (2003). Oxidative-stress-related changes in the livers of bile-duct-ligated rats. *J Biomed Sci*. Mar-Apr;10(2):170-8.
116. Huo L, Scarpulla RC. (2001). Mitochondrial DNA instability and peri-implantation lethality associated with targeted disruption of nuclear respiratory factor 1 in mice. *Mol Cell Biol*. Jan;21(2):644-54.
117. Iimuro Y, Nishio T, Morimoto T, Nitta T, Stefanovic B, Choi SK, Brenner DA, Yamaoka Y. (2003). Delivery of matrix metalloproteinase-1 attenuates established liver fibrosis in the rat. *Gastroenterology*. Feb;124(2):445-58.
118. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T; MULTIVIRC Group. (2001). Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet*. Apr 7;357(9262):1069-75.
119. Iritani BM, Delrow J, Grandori C, Gomez I, Klacking M, Carlos LS, Eisenman RN. (2002). Modulation of T-lymphocyte development, growth and cell size by the Myc antagonist and transcriptional repressor Mad1. *EMBO J*. Sep 16;21(18):4820-30.
120. Ishii K, Washio T, Uechi T, Yoshihama M, Kenmochi N, Tomita M. (2006). Characteristics and clustering of human ribosomal protein genes. *BMC Genomics*. Feb 28;7:37.
121. Iwagaki A, Choe N, Li Y, Hemenway DR, Kagan E. (2003). Asbestos inhalation induces tyrosine nitration associated with extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in the rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. Jan;28(1):51-60.
122. Iwaisako K, Hatano E, Taura K, Nakajima A, Tada M, Seo S, Tamaki N, Sato F, Ikai I, Uemoto S, Kinoshita M. (2008). Loss of Sept4 exacerbates liver fibrosis

- through the dysregulation of hepatic stellate cells. *J Hepatol.* Nov;49(5):768-78.
123. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. (2002). Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci.* Feb;65(2):166-76. Review.
 124. Jonsson JR, Clouston AD, Ando Y, Kelemen LI, Horn MJ, Adamson MD, Purdie DM, Powell EE. (2001). Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. *Gastroenterology.* Jul;121(1):148-55.
 125. Joseph AM, Rungi AA, Robinson BH, Hood DA. (2004). Compensatory responses of protein import and transcription factor expression in mitochondrial DNA defects. *Am J Physiol Cell Physiol.* Apr;286(4):C867-75.
 126. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* Jul;11(4):447-55.
 127. Kang PJ, Ostermann J, Shilling J, Neupert W, Craig EA, Pfanner N. (1990). Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature.* Nov 8;348(6297):137-43.
 128. Kaul SC, Deocaris CC, Wadhwa R. (2007). Three faces of mortalin: a housekeeper, guardian and killer. *Exp Gerontol.* Apr;42(4):263-74. Epub 2006 Dec 22. Review.
 129. Kiebler M, Pfaller R, Söllner T, Griffiths G, Horstmann H, Pfanner N, Neupert W. (1990). Identification of a mitochondrial receptor complex required for recognition and membrane insertion of precursor proteins. *Nature.* Dec 13;348(6302):610-6.
 130. Kim S, Li Q, Dang CV, Lee LA. (2000). Induction of ribosomal genes and hepatocyte hypertrophy by adenovirus-mediated expression of c-Myc in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 10;97(21):11198-202.
 131. Kitada T, Seki S, Iwai S, Yamada T, Sakaguchi H, Wakasa K. (2001). In situ detection of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in chronic human liver disease. *J Hepatol.* Nov;35(5):613-8.

132. Klein J, Grummt I. (1999). Cell cycle-dependent regulation of RNA polymerase I transcription: the nucleolar transcription factor UBF is inactive in mitosis and early G1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 25;96(11):6096-101.
133. Kopp K, Gasiorowski JZ, Chen D, Gilmore R, Norton JT, Wang C, Leary DJ, Chan EK, Dean DA, Huang S. (2007). Pol I transcription and pre-rRNA processing are coordinated in a transcription-dependent manner in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. Feb;18(2):394-403.
134. Krähenbühl L, Schäfer M, Krähenbühl S. (1998). Reversibility of hepatic mitochondrial damage in rats with long-term cholestasis. *J Hepatol*. Jun;28(6):1000-7.
135. Krähenbühl S, Stucki J, Reichen J. (1992). Reduced activity of the electron transport chain in liver mitochondria isolated from rats with secondary biliary cirrhosis. *Hepatology*. Jun;15(6):1160-6.
136. Krähenbühl S, Talos C, Reichen J. (1994). Mechanisms of impaired hepatic fatty acid metabolism in rats with long-term bile duct ligation. *Hepatology*. May;19(5):1272-81.
137. Krayl M, Lim JH, Martin F, Guiard B, Voos W. (2007). A cooperative action of the ATP-dependent import motor complex and the inner membrane potential drives mitochondrial pre-protein import. *Mol Cell Biol*. Jan;27(2):411-25.
138. Krimmer T, Rapaport D, Ryan MT, Meisinger C, Kassenbrock CK, Blachly-Dyson E, Forte M, Douglas MG, Neupert W, Nargang FE, Pfanner N. (2001). Biogenesis of porin of the outer mitochondrial membrane involves an import pathway via receptors and the general import pore of the TOM complex. *J Cell Biol*. Jan 22;152(2):289-300.
139. Lang C, Berardi S, Schäfer M, Serra D, Hegardt FG, Krähenbühl L, Krähenbühl S. (2002). Impaired ketogenesis is a major mechanism for disturbed hepatic fatty acid metabolism in rats with long-term cholestasis and after relief of biliary obstruction. *J Hepatol*. Nov;37(5):564-71.
140. Lang C, Schäfer M, Serra D, Hegardt F, Krähenbühl L, Krähenbühl S. (2001). Impaired hepatic fatty acid oxidation in rats with short-term cholestasis: characterization and mechanism. *J Lipid Res*. Jan;42(1):22-30.

141. Larsson NG, Barsh GS, Clayton DA. (1997). Structure and chromosomal localization of the mouse mitochondrial transcription factor A gene (TFAM). *Mamm Genome*. Feb;8(2):139-40
142. Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA. (1998). Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet*. 1998 Mar;18(3):231-6.
143. Legros F, Malka F, Frachon P, Lombès A, Rojo M. (2004). Organization and dynamics of human mitochondrial ADN. *J Cell Sci*. Jun 1;117(Pt 13):2653-62.
144. Leung PS, Suen PM, Ip SP, Yip CK, Chen G, Lai PB. (2003). Expression and localization of AT1 receptors in hepatic Kupffer cells: its potential role in regulating a fibrogenic response. *Regul Pept*. Nov 15;116(1-3):61-9.
145. Li B, Holloszy JO, Semenkovich CF. (1999). Respiratory uncoupling induces delta-aminolevulinate synthase expression through a nuclear respiratory factor-1-dependent mechanism in HeLa cells. *J Biol Chem*. Jun 18;274(25):17534-40.
146. Li X, Meng Y, Wu P, Zhang Z, Yang X. (2007). Angiotensin II and Aldosterone stimulating NF-kappaB and AP-1 activation in hepatic fibrosis of rat. *Regul Pept*. Jan 10;138(1):15-25.
147. Lieberman J. (1975). Elevation of serum angiotensin-converting-enzyme (ACE) level in sarcoidosis. *Am J Med*. Sep;59(3):365-72.
148. Lin J, Tarr PT, Yang R, Rhee J, Puigserver P, Newgard CB, Spiegelman BM. (2003). PGC-1beta in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *J Biol Chem*. Aug 15;278(33):30843-8.
149. Lin J, Wu PH, Tarr PT, Lindenberg KS, St-Pierre J, Zhang CY, Mootha VK, Jäger S, Vianna CR, Reznick RM, Cui L, Manieri M, Donovan MX, Wu Z, Cooper MP, Fan MC, Rohas LM, Zavacki AM, Cinti S, Shulman GI, Lowell BB, Krainc D, Spiegelman BM. (2004). Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1α null mice. *Cell*. Oct 1;119(1):121-35.

150. Liu C, Li S, Liu T, Borjigin J, Lin JD. (2007). Transcriptional coactivator PGC-1 α integrates the mammalian clock and energy metabolism. *Nature*. May 24;447(7143):477-81.
151. Lleo A, Invernizzi P, Mackay IR, Prince H, Zhong RQ, Gershwin ME. (2008). Etiopathogenesis of primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol*. Jun 7;14(21):3328-37. Review.
152. Lowell BB, Spiegelman BM. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*. Apr 6;404(6778):652-60. Review.
153. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. Nov;193(1):265-75.
154. Ludwig J, Dickson ER, McDonald GS. (1978). Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis). *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*. Aug 22;379(2):103-12.
155. Lunz JG 3rd, Tsuji H, Nozaki I, Murase N, Demetris AJ. (2005). An inhibitor of cyclin-dependent kinase, stress-induced p21Waf-1/Cip-1, mediates hepatocyte mito-inhibition during the evolution of cirrhosis. *Hepatology*. Jun;41(6):1262-71.
156. Luo J, Sladek R, Carrier J, Bader JA, Richard D, Giguère V. (2003). Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha. *Mol Cell Biol*. Nov;23(22):7947-56.
157. Ma K, Zhang Y, Elam MB, Cook GA, Park EA. (2005). Cloning of the rat pyruvate dehydrogenase kinase 4 gene promoter: activation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator. *J Biol Chem*. Aug 19;280(33):29525-32.
158. Maggi LB Jr, Kuchenruether M, Dadey DY, Schwoppe RM, Grisendi S, Townsend RR, Pandolfi PP, Weber JD. (2008). Nucleophosmin serves as a rate-limiting nuclear export chaperone for the Mammalian ribosome. *Mol Cell Biol*. Dec;28(23):7050-65.

159. Mandel H, Hartman C, Berkowitz D, Elpeleg ON, Manov I, Iancu TC. (2001). The hepatic mitochondrial DNA depletion syndrome: ultrastructural changes in liver biopsies. *Hepatology*. Oct;34(4 Pt 1):776-84.
160. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem*. Jun 15;87(1):206-10.
161. Martin J, Mahlke K, Pfanner N. (1991). Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. Delta psi drives the movement of presequences. *J Biol Chem*. Sep 25;266(27):18051-7.
162. Maya R, Oren M. (2000). Unmasking of phosphorylation-sensitive epitopes on p53 and Mdm2 by a simple Western-phosphatase procedure. *Oncogene*. Jun 29;19(28):3213-5.
163. Mayer A, Neupert W, Lill R. (1995). Mitochondrial protein import: reversible binding of the presequence at the trans side of the outer membrane drives partial translocation and unfolding. *Cell*. Jan 13;80(1):127-37.
164. Mayer C, Bierhoff H, Grummt I. (2005). The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis. *Genes Dev*. Apr 15;19(8):933-41. Epub 2005 Apr 1.
165. Mayer C, Grummt I. (2005). Cellular stress and nucleolar function. *Cell Cycle*. Aug;4(8):1036-8. Epub 2005 Aug 20. Review.
166. Mayer C, Zhao J, Yuan X, Grummt I. (2004). mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev*. Feb 15;18(4):423-34.
167. McAllister-Lucas LM, Ruland J, Siu K, Jin X, Gu S, Kim DS, Kuffa P, Kohrt D, Mak TW, Nuñez G, Lucas PC. (2007). CARMA3/Bcl10/MALT1-dependent NF-kappaB activation mediates angiotensin II-responsive inflammatory signaling in nonimmune cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 2;104(1):139-44.
168. McGill JM, Kwiatkowski AP. (1998). Cholestatic liver diseases in adults. *Am J Gastroenterol*. 1998 May;93(5):684-91.

169. McNaughton L, Puttagunta L, Martinez-Cuesta MA, Kneteman N, Mayers I, Moqbel R, Hamid Q, Radomski MW. (2002). Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 24;99(26):17161-6.
170. Meirhaeghe A, Crowley V, Lenaghan C, Lelliott C, Green K, Stewart A, Hart K, Schinner S, Sethi JK, Yeo G, Brand MD, Cortright RN, O'Rahilly S, Montague C, Vidal-Puig AJ. (2003). Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo. *Biochem J*. Jul 1;373(Pt 1):155-65.
171. Michels AA, Hernandez N. (2006). Does Pol I talk to Pol II? Coordination of RNA polymerases in ribosome biogenesis. *Genes Dev*. Aug 1;20(15):1982-5.
172. Milani S, Herbst H, Schuppan D, Kim KY, Riecken EO, Stein H. (1990). Procollagen expression by nonparenchymal rat liver cells in experimental biliary fibrosis. *Gastroenterology*. Jan;98(1):175-84.
173. Miyazaki, H., Van Eyken, P., Roskams, T., De Vos, R., and Desmet, V. J. (1993). Transient expression of tenascin in experimentally induced cholestatic fibrosis in rat liver: an immunohistochemical study. *J Hepatol*. 19, 353-66.
174. Miyoshi H, Rust C, Roberts PJ, Burgart LJ, Gores GJ. (1999). Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterology*. Sep;117(3):669-77.
175. Moczko M, Bömer U, Kübrich M, Zufall N, Hönlinger A, Pfanner N. (1997). The intermembrane space domain of mitochondrial Tom22 functions as a trans binding site for pre-proteins with N-terminal targeting sequences. *Mol Cell Biol*. Nov;17(11):6574-84.
176. Morrish F, Giedt C, Hockenbery D. (2003). c-MYC apoptotic function is mediated by NRF-1 target genes. *Genes Dev*. Jan 15;17(2):240-55.
177. Nam CW, Park NH, Park BR, Shin JW, Jung SW, Na YW, Seo JH. (2008). Mitotic checkpoint gene MAD1 in hepatocellular carcinoma is associated with tumor recurrence after surgical resection. *J Surg Oncol*. Jun 1;97(7):567-71.

178. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO. (2003). Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*. Feb 7;299(5608):896-9.
179. Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO. (2005). Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science*. Oct 14;310(5746):314-7.
180. Ogawa K, Chen F, Kuang C, Chen Y. (2004). Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor-beta is mediated by a nuclear factor-kappaB site. *Biochem J*. Jul 15;381(Pt 2):413-22.
181. Ohgaki H, Sanderson ND, Ton P, Thorgeirsson SS. (1996). Molecular analyses of liver tumors in c-myc transgenic mice and c-myc and TGF-alpha double transgenic mice. *Cancer Lett*. Aug 23;106(1):43-9.
182. Ohishi T, Saito H, Tsusaka K, Toda K, Inagaki H, Hamada Y, Kumagai N, Atsukawa K, Ishii H. (2001). Anti-fibrogenic effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor on chronic carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *Hepato Res*. Oct;21(2):147-158.
183. Ohmori H, Murakami T, Furutani A, Higashi K, Hirano H, Gotoh S, Kuroiwa A, Masui A, Nakamura T, Amalric F. (1990). Simultaneous activation of heat shock protein (hsp 70) and nucleolin genes during in vivo and in vitro prereplicative stages of rat hepatocytes. *Exp Cell Res*. Aug;189(2):227-32.
184. Omura T. (1998). Mitochondria-targeting sequence, a multi-role sorting sequence recognized at all steps of protein import into mitochondria. *J Biochem*. Jun;123(6):1010-6. Review.
185. Ongwijitwat S, Liang HL, Graboyes EM, Wong-Riley MT. (2006). Nuclear respiratory factor 2 senses changing cellular energy demands and its silencing down-regulates cytochrome oxidase and other target gene mRNAs. *Gene*. Jun 7;374:39-49.

186. Ongwijitwat S, Wong-Riley MT. (2004). Functional analysis of the rat cytochrome c oxidase subunit 6A1 promoter in primary neurons. *Gene*. Aug 4;337:163-71.
187. Oskarsson T, Trumpp A. (2005). The Myc trilogy: lord of RNA polymerases. *Nat Cell Biol*. Mar;7(3):295-302.
188. Ozawa K, Tanaka J, Ukigusa M, Kimura K, Tobe T. (1979). Early metabolic disturbances in the liver following unilateral hepatic or common bile duct obstruction in rabbits. *Eur Surg Res*. 11(1):61-70.
189. Paizis G, Cooper ME, Schembri JM, Tikellis C, Burrell LM, Angus PW. (2002). Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver. *Gastroenterology*. Nov;123(5):1667-76.
190. Palomer X, Alvarez-Guardia D, Rodríguez-Calvo R, Coll T, Laguna JC, Davidson MM, Chan TO, Feldman AM, Vázquez-Carrera M. (2008). TNF- α reduces PGC-1 α expression through NF- κ B and p38 MAPK leading to increased glucose oxidation in a human cardiac cell model. *Cardiovasc Res*. Dec 15.
191. Panov KI, Friedrich JK, Russell J, Zomerdijk JC. (2006). UBF activates RNA polymerase I transcription by stimulating promoter escape. *EMBO J*. Jul 26;25(14):3310-22.
192. Parisi MA, Clayton DA. (1991). Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science*. May 17;252(5008):965-9.
193. Pelengaris S, Rudolph B, Littlewood T. (2000). Action of Myc in vivo - proliferation and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev*. Feb;10(1):100-5. Review.
194. Pelletier G, Stefanovsky VY, Faubladiere M, Hirschler-Laszkiwicz I, Savard J, Rothblum LI, Côté J, Moss T. (2000). Competitive recruitment of CBP and Rb-HDAC regulates UBF acetylation and ribosomal transcription. *Mol Cell*. Nov;6(5):1059-66.

195. Pérez Fernández T, López Serrano P, Tomás E, Gutiérrez ML, Lledó JL, Cacho G, Santander C, Fernández Rodríguez CM. (2004). Diagnostic and therapeutic approach to cholestatic liver disease. *Rev Esp Enferm Dig.* Jan;96(1):60-73.
196. Piantadosi CA, Suliman HB. (2006). Mitochondrial transcription factor A induction by redox activation of nuclear respiratory factor 1. *J Biol Chem.* Jan 6;281(1):324-33.
197. Pinzani M. (1999). Liver fibrosis. *Springer Semin Immunopathol.* 21(4):475-90. Review.
198. Pizzimenti S, Briatore F, Laurora S, Toaldo C, Maggio M, De Grandi M, Meaglia L, Menegatti E, Giglioni B, Dianzani MU, Barrera G. (2006). 4-Hydroxynonenal inhibits telomerase activity and hTERT expression in human leukemic cell lines. *Free Radic Biol Med.* May 1;40(9):1578-91.
199. Poortinga G, Hannan KM, Snelling H, Walkley CR, Jenkins A, Sharkey K, Wall M, Brandenburger Y, Palatsides M, Pearson RB, McArthur GA, Hannan RD. (2004). MAD-1 and c-MYC regulate UBF and rDNA transcription during granulocyte differentiation. *EMBO J.* Aug 18;23(16):3325-35.
200. Prives C. (1998). Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell.* Oct 2;95(1):5-8. Review.
201. Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY, Krauss S, Mootha VK, Lowell BB, Spiegelman BM. (2001). Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell.* Nov;8(5):971-82.
202. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.* Mar 20;92(6):829-39.
203. Purps O, Lahme B, Gressner AM, Meindl-Beinker NM, Dooley S. (2007). Loss of TGF-beta dependent growth control during HSC transdifferentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* Feb 16;353(3):841-7.
204. Ramachandran B, Yu G, Gulick T. (2008). Nuclear respiratory factor 1 controls myocyte enhancer factor 2A transcription to provide a mechanism

- for coordinate expression of respiratory chain subunits. *J Biol Chem.* May 2;283(18):11935-46.
205. Rana B, Mischoulon D, Xie Y, Bucher NL, Farmer SR. (1994). Cell-extracellular matrix interactions can regulate the switch between growth and differentiation in rat hepatocytes: reciprocal expression of C/EBP alpha and immediate-early growth response transcription factors. *Mol Cell Biol.* Sep;14(9):5858-69.
206. Rapaport D, Neupert W, Lill R. (1997). Mitochondrial protein import. Tom40 plays a major role in targeting and translocation of pre-proteins by forming a specific binding site for the presequence. *J Biol Chem.* Jul 25;272(30):18725-31.
207. Rassow J, Pfanner N. (1991). Mitochondrial pre-proteins en route from the outer membrane to the inner membrane are exposed to the intermembrane space. *FEBS Lett.* Nov 18;293(1-2):85-8.
208. Regev-Rudzki N, Yogev O, Pines O. (2008). The mitochondrial targeting sequence tilts the balance between mitochondrial and cytosolic dual localization. *J Cell Sci.* Jul 15;121(Pt 14):2423-31.
209. Reuben A. (2002). Ito becomes a star. *Hepatology.* Feb;35(2):503-4.
210. Rippe RA, Schrum LW, Stefanovic B, Solís-Herruzo JA, Brenner DA. (1999). NF-kappaB inhibits expression of the alpha1(I) collagen gene. *DNA Cell Biol.* Oct;18(10):751-61.
211. Ristevski S, O'Leary DA, Thornell AP, Owen MJ, Kola I, Hertzog PJ. (2004). The ETS transcription factor GABPalpha is essential for early embryogenesis. *Mol Cell Biol.* Jul;24(13):5844-9.
212. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature.* Mar 3;434(7029):113-8.
213. Rodgers JT, Puigserver P. (2007). Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 31;104(31):12861-6.

214. Rodrigues CM, Steer CJ. (1999). Bile acids and hepatocyte apoptosis: living/leaving life in the Fas lane. *Gastroenterology*. Sep;117(3):732-6.
215. Rodríguez JL, Sandoval J, Serviddio G, Sastre J, Morante M, Perrelli MG, Martínez-Chantar ML, Viña J, Viña JR, Mato JM, Avila MA, Franco L, López-Rodas G, Torres L. (2006). Id2 leaves the chromatin of the E2F4-p130-controlled c-myc promoter during hepatocyte priming for liver regeneration. *Biochem J*. Sep 15;398(3):431-7.
216. Rodríguez-Garay EA. (2003). Cholestasis: human disease and experimental animal models. *Ann Hepatol*. Oct-Dec;2(4):150-8. Review.
217. Rolo AP, Oliveira PJ, Moreno AJ, Palmeira CM. (2000). Bile acids affect liver mitochondrial bioenergetics: possible relevance for cholestasis therapy. *Toxicol Sci*. Sep;57(1):177-85.
218. Romero FJ, Viña J. (1983). A simple procedure for the preparation of isolated liver cells. *Biochem Educ*. 11:135-6.
219. Rostovtseva TK, Bezrukov SM. (1998). ATP transport through a single mitochondrial channel, VDAC, studied by current fluctuation analysis. *Biophys J*. May;74(5):2365-73.
220. Rowley N, Prip-Buus C, Westermann B, Brown C, Schwarz E, Barrell B, Neupert W. (1994). Mdj1p, a novel chaperone of the DnaJ family, is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding. *Cell*. Apr 22;77(2):249-59.
221. Rungi AA, Primeau A, Nunes Christie L, Gordon JW, Robinson BH, Hood DA. (2002). Events upstream of mitochondrial protein import limit the oxidative capacity of fibroblasts in multiple mitochondrial disease. *Biochim Biophys Acta*. Mar 16;1586(2):146-54.
222. Russell AP, Feilchenfeldt J, Schreiber S, Praz M, Crettenand A, Gobelet C, Meier CA, Bell DR, Kralli A, Giacobino JP, Dériaz O. (2003). Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes*. Dec;52(12):2874-81.

223. Russell LK, Mansfield CM, Lehman JJ, Kovacs A, Courtois M, Saffitz JE, Medeiros DM, Valencik ML, McDonald JA, Kelly DP. (2004). Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. *Circ Res*. Mar 5;94(4):525-33.
224. Sanvito F, Piatti S, Villa A, Bossi M, Lucchini G, Marchisio PC, Biffo S. (1999). The beta4 integrin interactor p27(BBP/eIF6) is an essential nuclear matrix protein involved in 60S ribosomal subunit assembly. *J Cell Biol*. Mar 8;144(5):823-37.
225. Savagner F, Mirebeau D, Jacques C, Guyetant S, Morgan C, Franc B, Reynier P, Malthièry Y. (2003). PGC-1-related coactivator and targets are upregulated in thyroid oncocyoma. *Biochem Biophys Res Commun*. Oct 24;310(3):779-84.
226. Scarpulla RC. (1997). Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. *J Bioenerg Biomembr*. Apr;29(2):109-19. Review.
227. Scarpulla RC. (2002a). Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta*. Jun 7;1576(1-2):1-14. Review.
228. Scarpulla RC. (2002b). Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene*. Mar 6;286(1):81-9.
229. Scarpulla RC. (2006). Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem*. Mar 1;97(4):673-83. Review.
230. Scarpulla RC. (2008). Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev*. Apr;88(2):611-38. Review.
231. Schlosser I, Hölzel M, Mürnseer M, Burtscher H, Weidle UH, Eick D. (2003). A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing. *Nucleic Acids Res*. Nov 1;31(21):6148-56.

232. Schlossmann J, Dietmeier K, Pfanner N, Neupert W. (1994). Specific recognition of mitochondrial pre-proteins by the cytosolic domain of the import receptor MOM72. *J Biol Chem.* 1994 Apr 22;269(16):11893-901.
233. Segui-Real B, Kispal G, Lill R, Neupert W. (1993). Functional independence of the protein translocation machineries in mitochondrial outer and inner membranes: passage of pre-proteins through the intermembrane space. *EMBO J.* May;12(5):2211-8.
234. Sepuri NB, Gordon DM, Pain D. (1998b). A GTP-dependent "push" is generally required for efficient protein translocation across the mitochondrial inner membrane into the matrix. *J Biol Chem.* Aug 14;273(33):20941-50.
235. Sepuri NB, Schülke N, Pain D. (1998a). GTP hydrolysis is essential for protein import into the mitochondrial matrix. *J Biol Chem.* Jan 16;273(3):1420-4.
236. Serviddio G, Pereda J, Pallardó FV, Carretero J, Borrás C, Cutrin J, Vendemiale G, Poli G, Viña J, Sastre J. (2004). Ursodeoxycholic acid protects against secondary biliary cirrhosis in rats by preventing mitochondrial oxidative stress. *Hepatology.* Mar;39(3):711-20.
237. Sheffield WP, Shore GC, Randall SK. (1990). Mitochondrial precursor protein. Effects of 70-kilodalton heat shock protein on polypeptide folding, aggregation, and import competence. *J Biol Chem.* Jul 5;265(19):11069-76.
238. Shin DJ, Campos JA, Gil G, Osborne TF. (2003). PGC-1 α activates CYP7A1 and bile acid biosynthesis. *J Biol Chem.* Dec 12;278(50):50047-52.
239. Singh B, Patel HV, Ridley RG, Freeman KB, Gupta RS. (1990). Mitochondrial import of the human chaperonin (HSP60) protein. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 15;169(2):391-6.
240. Singh B, Soltys BJ, Wu ZC, Patel HV, Freeman KB, Gupta RS. (1997). Cloning and some novel characteristics of mitochondrial HSP70 from Chinese hamster cells. *Exp Cell Res.* Aug 1;234(2):205-16.
241. Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. (1999). The mitotically phosphorylated form of the transcription termination factor TTF-1 is

- associated with the repressed rDNA transcription machinery. *J Cell Sci.* Oct;112 (Pt 19):3259-68.
242. Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. (2000). In vivo release of mitotic silencing of ribosomal gene transcription does not give rise to precursor ribosomal RNA processing. *J Cell Biol.* Jan 24;148(2):259-70.
243. Sokol RJ, Dahl R, Devereaux MW, Yerushalmi B, Kobak GE, Gumprich E. (2005). Human hepatic mitochondria generate reactive oxygen species and undergo the permeability transition in response to hydrophobic bile acids. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* Aug;41(2):235-43.
244. Sokol RJ, Devereaux M, Khandwala R, O'Brien K. (1993). Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes. *Hepatology.* May;17(5):869-81.
245. Sokol RJ, Winklhofer-Roob BM, Devereaux MW, McKim JM Jr. (1995). Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology.* Oct;109(4):1249-56.
246. Spelbrink JN, Van den Bogert C. (1995). The pre-mRNA of nuclear respiratory factor 1, a regulator of mitochondrial biogenesis, is alternatively spliced in human tissues and cell lines. *Hum Mol Genet.* Sep;4(9):1591-6.
247. Stefanovsky V, Langlois F, Gagnon-Kugler T, Rothblum LI, Moss T. (2006a). Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling. *Mol Cell.* Mar 3;21(5):629-39.
248. Stefanovsky V, Moss T. (2006c). Regulation of rRNA synthesis in human and mouse cells is not determined by changes in active gene count. *Cell Cycle.* Apr;5(7):735-9.
249. Stefanovsky VY, Langlois F, Bazett-Jones D, Pelletier G, Moss T. (2006b). ERK modulates DNA bending and enhancesome structure by phosphorylating HMG1-boxes 1 and 2 of the RNA polymerase I transcription factor UBF. *Biochemistry.* Mar 21;45(11):3626-34.

250. Stefanovsky VY, Pelletier G, Hannan R, Gagnon-Kugler T, Rothblum LI, Moss T. (2001). An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol Cell. Nov;8(5):1063-73.*
251. St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB, Spiegelman BM. (2003). Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1 α and PGC-1beta) in muscle cells. *J Biol Chem. Jul 18;278(29):26597-603.*
252. Suliman HB, Carraway MS, Welty-Wolf KE, Whorton AR, Piantadosi CA. (2003). Lipopolysaccharide stimulates mitochondrial biogenesis via activation of nuclear respiratory factor-1. *J Biol Chem. Oct 17;278(42):41510-8.*
253. Suliman HB, Welty-Wolf KE, Carraway M, Tatro L, Piantadosi CA. (2004). Lipopolysaccharide induces oxidative cardiac mitochondrial damage and biogenesis. *Cardiovasc Res. Nov 1;64(2):279-88.*
254. Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Caradonna Z, Alvaro D, Marzioni M, Saccomanno S, Candelaresi C, Trozzi L, Macarri G, Benedetti A, Folli F. (2003). Regulation of ERK/JNK/p70S6K in two rat models of liver injury and fibrosis. *J Hepatol. Oct;39(4):528-37.*
255. Szasz G. (1969). A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl transpeptidase. *Clin Chem. Feb;15(2):124-36.*
256. Sze KM, Ching YP, Jin DY, Ng IO. (2008). Role of a novel splice variant of mitotic arrest deficient 1 (MAD1), MAD1beta, in mitotic checkpoint control in liver cancer. *Cancer Res. Nov 15;68(22):9194-201.*
257. Talwalkar JA, Lindor KD. (2003). Primary biliary cirrhosis. *Lancet. Jul 5;362(9377):53-61. Review.*
258. Tanaka A, Feng Z, Inomoto T, Mori S, Tokuka A, Shinohara H, Kataoka M, Yamaoka Y, Ozawa K. (1995). Kinetic analysis of impaired work-cost performance in jaundiced rabbit liver. *Res Exp Med (Berl). 195(2):77-84.*

259. Tanaka A, Miyakawa H, Luketic VA, Kaplan M, Storch WB, Gershwin ME. (2002). The diagnostic value of anti-mitochondrial antibodies, especially in primary biliary cirrhosis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. May;48(3):295-9. Review.
260. Taniguchi F, Harada T, Sakamoto Y, Yamauchi N, Yoshida S, Iwabe T, Terakawa N. (2003). Activation of mitogen-activated protein kinase pathway by keratinocyte growth factor or fibroblast growth factor-10 promotes cell proliferation in human endometrial carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*. Feb;88(2):773-80.
261. Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, Silva Vaz MF, Silveira TR, Marroni CA, Marroni NP, Henriques JA, Picada JN. (2007). Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food Chem Toxicol*. Jul;45(7):1140-6.
262. Uchinami H, Seki E, Brenner DA, D'Armiento J. (2006). Loss of MMP 13 attenuates murine hepatic injury and fibrosis during cholestasis. *Hepatology*. Aug;44(2):420-9.
263. Ueberham E, Löw R, Ueberham U, Schönig K, Bujard H, Gebhardt R. (2003). Conditional tetracycline-regulated expression of TGF-beta1 in liver of transgenic mice leads to reversible intermediary fibrosis. *Hepatology*. May;37(5):1067-78.
264. Vega RB, Huss JM, Kelly DP. (2000). The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol*. Mar;20(5):1868-76.
265. Vendemiale G, Grattagliano I, Lupo L, Memeo V, Altomare E. (2002). Hepatic oxidative alterations in patients with extra-hepatic cholestasis. Effect of surgical drainage. *J Hepatol*. Nov;37(5):601-5.
266. Vercauteren K, Pasko RA, Gleyzer N, Marino VM, Scarpulla RC. (2006). PGC-1-related coactivator: immediate early expression and characterization of a CREB/NRF-1 binding domain associated with cytochrome c promoter occupancy and respiratory growth. *Mol Cell Biol*. Oct;26(20):7409-19.

267. Verner K. (1993). Co-translational protein import into mitochondria: an alternative view. *Trends Biochem Sci.* Oct;18(10):366-71. Review.
268. Viñas O, Bataller R, Sancho-Bru P, Ginès P, Berenguer C, Enrich C, Nicolás JM, Ercilla G, Gallart T, Vives J, Arroyo V, Rodés J. (2003). Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology.* Oct;38(4):919-29.
269. Virbasius JV, Scarpulla RC. (1994). Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 15;91(4):1309-13.
270. Virbasius JV, Virbasius CA, Scarpulla RC. (1993). Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters. *Genes Dev.* Mar;7(3):380-92.
271. Vita M, Henriksson M. (2006). The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol.* Aug;16(4):318-30. Review.
272. Voit R, Grummt I. (2001). Phosphorylation of UBF at serine 388 is required for interaction with RNA polymerase I and activation of rDNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 20;98(24):13631-6.
273. Voit R, Hoffmann M, Grummt I. Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *EMBO J.* 1999 Apr 1;18(7):1891-9.
274. Voit R, Schäfer K, Grummt I. (1997). Mechanism of repression of RNA polymerase I transcription by the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol.* Aug;17(8):4230-7.
275. von Ahsen O, Voos W, Henninger H, Pfanner N. (1995). The mitochondrial protein import machinery. Role of ATP in dissociation of the HSP70.Mim44 complex. *J Biol Chem.* Dec 15;270(50):29848-53.

276. Voos W, Martin H, Krimmer T, Pfanner N. (1999). Mechanisms of protein translocation into mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. Nov 16;1422(3):235-54. Review.
277. Voss M, Wolff B, Savitskaia N, Ungefroren H, Deppert W, Schmiegel W, Kalthoff H, Naumann M. (1999). TGFbeta-induced growth inhibition involves cell cycle inhibitor p21 and pRb independent from p15 expression. *Int J Oncol*. Jan;14(1):93-101.
278. Wächter S, Krähenbühl L, Schäfer M, Krähenbühl S. (1999). The liver carnitine pool reflects alterations in hepatic fatty acid metabolism in rats with bile duct ligation before and after biliodigestive anastomosis. *J Hepatol*. Feb;30(2):242-8.
279. Walker C, Böttger S, Low B. (2006). Mortalin-based cytoplasmic sequestration of p53 in a nonmammalian cancer model. *Am J Pathol*. May;168(5):1526-30.
280. Wang C, Li Z, Lu Y, Du R, Katiyar S, Yang J, Fu M, Leader JE, Quong A, Novikoff PM, Pestell RG. (2006). Cyclin D1 repression of nuclear respiratory factor 1 integrates nuclear DNA synthesis and mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 1;103(31):11567-72.
281. Warner JR. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci*. Nov;24(11):437-40. Review.
282. Wei CL, Hon WM, Lee KH, Khoo HE. (2005a). Temporal expression of hepatic inducible nitric oxide synthase in liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. Jan 21;11(3):362-7.
283. Wei CL, Hon WM, Lee KH, Khoo HE. (2005b). Chronic administration of aminoguanidine reduces vascular nitric oxide production and attenuates liver damage in bile duct-ligated rats. *Liver Int*. Jun;25(3):647-56.
284. Wei CL, Khoo HE, Lee KH, Hon WM. (2002). Differential expression and localization of nitric oxide synthases in cirrhotic livers of bile duct-ligated rats. *Nitric Oxide*. Sep;7(2):91-102.

285. Wei HS, Li DG, Lu HM, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Zhang J, Cheng JL, Xu QF. (2000). Effects of AT1 receptor antagonist, losartan, on rat hepatic fibrosis induced by CCl(4). *World J Gastroenterol*. Aug;6(4):540-545.
286. Wende AR, Huss JM, Schaeffer PJ, Giguère V, Kelly DP. (2005). PGC-1 α coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERR α : a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. *Mol Cell Biol*. Dec;25(24):10684-94.
287. White RJ. (2005). RNA polymerases I and III, growth control and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Jan;6(1):69-78. Review.
288. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*. Jul 9;98(1):115-24.
289. Yaguchi T, Aida S, Kaul SC, Wadhwa R. (2007). Involvement of mortalin in cellular senescence from the perspective of its mitochondrial import, chaperone, and oxidative stress management functions. *Ann N Y Acad Sci*. Apr;1100:306-11. Review.
290. Yang H, Li TW, Ko KS, Xia M, Lu SC. (2008). Switch from Mnt-Max to Myc-Max induces p53 and cyclin D1 expression and apoptosis during cholestasis in mouse and human hepatocytes. *Hepatology*. Dec 11.
291. Yang L, Bataller R, Dulyx J, Coffman TM, Ginès P, Rippe RA, Brenner DA. (2005). Attenuated hepatic inflammation and fibrosis in angiotensin type 1a receptor deficient mice. *J Hepatol*. Aug;43(2):317-23.
292. Yang ZF, Mott S, Rosmarin AG. (2007). The Ets transcription factor GABP is required for cell-cycle progression. *Nat Cell Biol*. Mar;9(3):339-46.
293. Yasui H, Hino O, Ohtake K, Machinami R, Kitagawa T. (1992). Clonal growth of hepatitis B virus-integrated hepatocytes in cirrhotic liver nodules. *Cancer Res*. Dec 15;52(24):6810-4.

294. Yin PH, Lee HC, Chau GY, Wu YT, Li SH, Lui WY, Wei YH, Liu TY, Chi CW. (2004). Alteration of the copy number and deletion of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. Jun 14;90(12):2390-6.
295. Yokoyama, Y., Xu, H., Kresge, N., Keller, S., Sarmadi, A. H., Baveja, R., Clemens, M. G., and Zhang, J. X. (2003). Role of thromboxane A2 in early BDL-induced portal hypertension. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 284:G453-60.
296. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*. Sep 13;413(6852):131-8.
297. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Yanase K, Namisaki T, Imazu H, Fukui H. (2002). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology*. Oct;36(4 Pt 1):850-60.
298. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. (2001). Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology*. Oct;34(4 Pt 1):745-50.
299. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Yanase K, Namisaki T, Yamazaki M, Tsujinoue H, Imazu H, Fukui H. (2003). Angiotensin-II induces the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 through the protein kinase-C signaling pathway in rat liver fibrosis development. *Hepatol Res*. Sep;27(1):51-56.
300. Younes RN, Poggetti RS, Fontes B, Itinoshe MM, Yoshida VM, Carvalho ME, Birolini D. Obstructive jaundice induces early depression of mitochondrial respiration in rat hepatocytes. *Acta Cir Bras*. Jul-Aug;22(4):251-4.
301. Young JC, Hoogenraad NJ, Hartl FU. (2003). Molecular chaperones Hsp90 and HSP70 deliver pre-proteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell*. Jan 10;112(1):41-50.

302. Yung B.Y. (2004). c-Myc-mediated expression of nucleophosmin/B23 decreases during retinoic acid-induced differentiation of human leukemia HL-60 cells. *FEBS Lett.* Dec 17;578(3):211-6.
303. Zhang FK, Jia JD, Wang BE. (2004). Clinical evaluation of serum antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* May;3(2):288-91.
304. Zhang Q, Wang Y. (2008). High mobility group proteins and their post-translational modifications. *Biochim Biophys Acta.* Sep;1784(9):1159-66. Review.
305. Zimmermann H, Kurzen P, Klossner W, Renner EL, Marti U. (1996). Decreased constitutive hepatic nitric oxide synthase expression in secondary biliary fibrosis and its changes after Roux-en-Y choledocho-jejunostomy in the rat. *J Hepatol.* Oct;25(4):567-73.