



**EFFECTOS RENALES DE LOS INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA  
CICLOOXIGENASA-2 (COX-2) EN LA CIRROSIS. ESTUDIOS *IN VIVO* EN RATAS  
INDUCIDAS A CIRROSIS Y ESTUDIOS *IN VITRO* EN CÉLULAS MESANGIALES.**

Memoria presentada por  
**MARTA LÓPEZ PARRA**  
para optar al título de Doctora en Biología

Trabajo realizado bajo la dirección del **Dr. Joan Clària Enrich**, en la Unitat de DNA del  
Hospital Clínic de Barcelona.

Marta López Parra

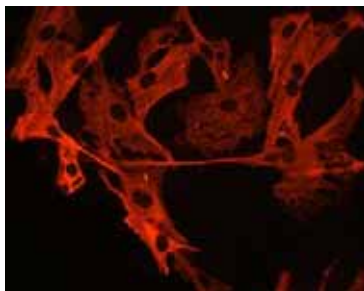
Dr. Joan Clària Enrich  
Director

Dr. Joan Rodés Teixidor  
Tutor

Tesis inscrita en el programa de doctorado Biopatología en Medicina  
*Departament de Medicina, Facultat de Medicina*, bienio 1.999-2.001

Foto de la portada: inmunocitoquímica de la actina  $\alpha$  de músculo liso en células mesangiales, modificada posteriormente con el programa Adobe Photoshop 6.0.

Foto original:



*La grandeza está en el empeño, no en el resultado,*  
de la película "Historia de un beso", de José Luís Garci.

A mis padres y a Carlos,  
por todo lo que significan en mi vida.



## ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
ADH	Hormona antidiurética
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
$\alpha$ -SMA	<i><math>\alpha</math>-Smooth Muscle Actin</i> (actina $\alpha$ de músculo liso)
ATP	Adenosín trifosfato
B-LT <sub>1</sub> /B-LT <sub>2</sub>	Receptores de membrana 1 y 2 del LTB <sub>4</sub>
bp	<i>Base pairs</i> (pares de bases)
CCl <sub>4</sub>	Tetracloruro de carbono
CC-1	Línea celular establecida de hepatocitos de rata
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CoA	Coenzima A
COS7	Línea de células renales de mono
COX	Ciclooxigenasa
COXIBs	Inhibidores selectivos de la COX-2
cPLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub> citosólica
CRL-2192	Línea establecida de macrófagos alveolares de rata
CYP	Citocromo P450
Cys-LT <sub>1</sub> /Cys-LT <sub>2</sub>	Receptores de membrana 1 y 2 de los cisteinil-LTs
DHA	Ácido docosahenoico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D. O.	Densidad óptica
EET	Ácido epoxieicosatrienoico
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EMA	<i>European Agency for the Evaluation of Medical products</i>
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FCS	<i>Foetal calf serum</i> (suero fetal bovino)
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FG	Filtrado glomerular
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FLAP	<i>Five lipoxygenase activating protein</i>
FPR	Flujo plasmático renal

GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfatodeshidrogenasa
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
HETE	Ácido hidroxieicosatetraenoico
HODE	Ácido hidroxioctadecadienoico
HpETE	Ácido hidroperoxieicosatetraenoico
IC <sub>50</sub>	Concentración de fármaco que inhibe al 50%
IFN	Interferón
IL	Interleukina
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
Kb	Kilobases
kDa	KiloDalton
K <sub>M</sub>	Constante de Michaelis-Menten
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LO	Lipooxigenasa
LPS	Lipopolisacárido
LT	Leucotrieno
LX	Lipoxina
MAP kinasa	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mUOsm	Osmolalidad urinaria mínima
NO	Óxido nítrico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PG	Prostaglandina
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activating receptor</i>
PPREs	<i>PPAR-responsive elements</i>
RMC 85/4	Línea establecida de células mesangiales de rata
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
RT-PCR	Retrotranscripción acoplada a la PCR
RXR	Receptor del ácido 9-cis-retinoico
SHR	Síndrome hepatorenal
SNC	Sistema nervioso central
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SNS	Sistema nervioso simpático

---

SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
SRS-A	<i>Slow reacting substance of anaphylaxis</i>
TNF	<i>Tumoral necrosis factor</i>
TX	Tromboxano
TZD	Tiazolidinedionas
$U_{Na}V$	Excreción urinaria de sodio
$U_{PGE_2}V$	Excreción urinaria de $PGE_2$
V	Volumen urinario
$V_{max}$	Velocidad máxima a concentración saturante de sustrato
3'-UTR	<i>3'-untranslated region</i> (región 3' no traducida)
15d-PGJ <sub>2</sub>	15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ <sub>2</sub>





# Índice



# ***INTRODUCCIÓN***

<b>I. METABOLISMO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO.</b>	1
1.- Introducción	1
2.- Vía de las ciclooxigenasas (COX)	1
3.- Vía de las lipooxigenasas (LOs)	2
3.1.- 5-Lipooxigenasa (5-LO)	3
3.2.- 12-Lipooxigenasa (12-LO)	6
3.3.- 15-Lipooxigenasa (15-LO)	7
4.- Isoprostanos	8
5.- Vía del citocromo P450	9
<b>II. COX-1 y COX-2.</b>	10
1.- Estructura génica	10
2.- Estructura proteica	12
3.- Reacciones catalizadas por la COX	13
4.- Expresión de COX-1 y COX-2	15
5.- COX-3	15
<b>III. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EICOSANOIDES DERIVADOS DE LA COX.</b>	17
1.- Productos de la vía de la COX	17
2.- Receptores de prostanoïdes	18
2.1.- Receptores nucleares (PPARs). PPAR $\gamma$	10
2.1.1- 15d-PGJ <sub>2</sub>	22
2.1.2- Efectos terapéuticos de la activación del PPAR $\gamma$	24
3.- Acciones biológicas de los prostanoïdes	25
4.- COX y riñón	28
4.1.- Distribución de COX-1 / COX-2 y de sus metabolitos	28
4.2.- Acciones biológicas de los productos de la COX en el riñón	28
5.- Inhibidores de la COX	31
5.1.- Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)	31
5.2.- Inhibidores selectivos de la COX-2 (COXIBs)	32

<b>IV. CIRROSIS HEPÁTICA.</b>	34
1.- Fisiopatología	34
2.-Alteraciones hemodinámicas en la cirrosis	37
2.1- Hipertensión portal	37
2.2- Circulación hiperdinámica	38
3.- Disfunción renal en la cirrosis. Ascitis	39
3.1- Retención de sodio y agua	39
3.2- Síndrome hepatorenal (SHR)	41
4.- Papel de los eicosanoides en la disfunción renal	42
4.1- Prostaglandinas	42
4.1.1.- AINEs e insuficiencia renal en la cirrosis	43
4.2- Tromboxano	44
4.3.- Isoprostanos	45
4.4.- Leucotrienos	45
4.5.- Otros eicosanoides	46
 <b>OBJETIVOS</b>	 49
 <b>RESULTADOS</b>	 53
<b>1. Artículo 1.</b> Las prostaglandinas derivadas de la ciclooxigenasa-1 están involucradas en el mantenimiento de la función renal en ratas con cirrosis y ascitis.	53
<i>Cyclooxygenase-1 derived prostaglandins are involved in the maintenance of renal function in rats with cirrhosis and ascites. <u>López-Parra M. et al</u>, British Journal of Pharmacology 2002;135:891-900.</i>	
<b>2. Artículo 2.</b> El inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 celecoxib modula la formación de eicosanoides vasoconstrictores y activa el PPAR $\gamma$ . Influencia de la albúmina.	67
<i>The selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib modulates the formation of vasoconstrictor eicosanoids and activates PPAR<math>\gamma</math>. Influence of albumin. <u>López-Parra M. et al</u>, Journal of Hepatology 2005;42:75-81.</i>	
<b>3. Anexo al artículo 2.</b>	79

---

<b><i>DISCUSIÓN</i></b>	85
<b><i>CONCLUSIONES</i></b>	97
<b><i>ANEXO 1: Material y Métodos</i></b>	101
1. Modelo de inducción a cirrosis	101
2. Determinaciones de parámetros bioquímicos	102
3. Obtención de muestras biológicas	102
4. Cultivos celulares	103
5. Caracterización por inmunocitoquímica de la línea celular RMC 85/4	104
6. Extracción de RNA	105
7. RT-PCR	106
8. Determinación de los niveles de eicosanoides y renina	107
9. Ensayos de transactivación	108
10. Estadística	115
<b><i>ANEXO 2: Publicaciones derivadas</i></b>	119
<b><i>BIBLIOGRAFÍA</i></b>	123
<b><i>AGRADECIMIENTOS</i></b>	141
<b><u>ÍNDICE DE FIGURAS:</u></b>	
<b>Figura 1.</b> Metabolismo del ácido araquidónico	2
<b>Figura 2.</b> Biosíntesis transcelular de lipoxinas (LXs)	3
<b>Figura 3.</b> Vía de la 5-lipooxigenasa	4
<b>Figura 4.</b> Estructura cristalográfica de COX-1 y COX-2	12
<b>Figura 5.</b> Reacciones de ciclación y peroxidación de la COX	13
<b>Figura 6.</b> Vía de las ciclooxigenasas (COX)	14

<b>Figura 7.</b> Estructura proteica de las COX	17
<b>Figura 8.</b> Agonistas y regulación transcripcional de los PPARs	20
<b>Figura 9.</b> Síntesis no enzimática de la 15dPGJ <sub>2</sub>	23
<b>Figura 10.</b> Los COXIBs	33
<b>Figura 11.</b> Papel de las PGs en la función renal en la cirrosis	43
<b>Figura 12.</b> Representación de los plásmidos utilizados	108

**ÍNDICE DE TABLAS:**

<b>Tabla 1.</b> Efectos biológicos de las PGs y el TX	27
<b>Tabla 2.</b> Metabolitos mayoritarios de la COX en el riñón y sus efectos sobre la función renal	31
<b>Tabla 3.</b> Condiciones RT-PCR	107







# Introducción



## I.- METABOLISMO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

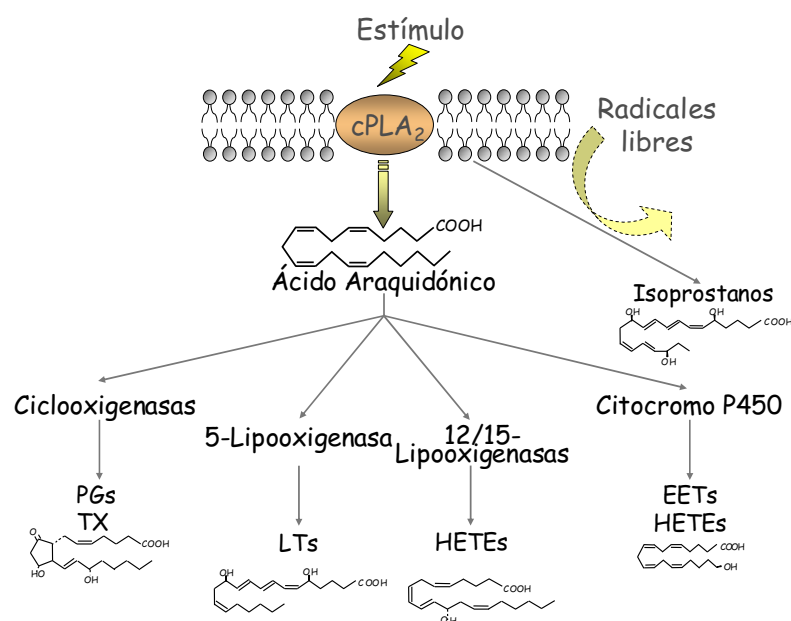
### 1.- Introducción:

El ácido araquidónico (AA) es un ácido graso poliinsaturado del tipo  $\omega$ -6, constituido por 20 átomos de carbono y cuya oxidación origina pequeños mediadores lipídicos que reciben el nombre de eicosanoides (del griego *eikosi-* que significa "veinte"). El AA se sintetiza en el hígado a partir de ácidos grasos esenciales de 18 átomos de carbono (en concreto el ácido linoleico y el ácido  $\alpha$ -linolénico) que se absorben en la dieta a través del intestino, y una vez sintetizado se almacena en la bicapa lipídica de las membranas celulares esterificado en forma de glicerofosfolípidos. En mamíferos, en respuesta a diversos estímulos que dependen del tipo celular, se activan diferentes receptores que activan a su vez varias fosfolipasas, destacando la PLA<sub>2</sub> citosólica (cPLA<sub>2</sub>) del grupo IV como la principal involucrada en la liberación del AA de las membranas celulares (Dennis, 1994). En estado de reposo, la concentración de AA intracelular libre es muy baja y está controlada parcialmente por dos actividades enzimáticas que lo reincorporan a los lípidos de membrana: la araquidonil-CoA sintasa y la araquidonil-CoA transferasa (Irvine, 1982; Murphy, 1989). No obstante, por las características moleculares y en particular por la presencia de cuatro dobles enlaces en posición *cis*, el AA es susceptible de reaccionar con la molécula de oxígeno. Esto puede ocurrir de manera no enzimática, contribuyendo al estrés oxidativo mediante la formación de isoprostanos, o a través de la acción de tres tipos de oxigenasas: las ciclooxigenasas (COX), que dan lugar a compuestos como las prostaglandinas (PGs) y los tromboxanos (TXs), las lipooxigenasas (LOs) que dan lugar a los ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos (HETEs) y a los leucotrienos (LTs) y las epoxigenasas o citocromos P450 que originan ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) e isómeros de los HETEs (Figura 1). La preponderancia de las distintas vías depende del tejido en cuestión, ya que la expresión de los diferentes enzimas del metabolismo del AA es específica de tejido.

### 2.- Vía de las ciclooxigenasas (COX):

De entre todas las rutas biosintéticas de eicosanoides, la vía de la COX se considera la más importante, debido al papel principal que desempeñan las PGs en los procesos inflamatorios y su participación en determinadas funciones fisiológicas, como por ejemplo el mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica, la modulación de la hemodinámica

microvascular renal, la liberación de renina, y la reabsorción de agua y sodio. Por todas estas acciones tan diversas que desempeñan las PGs, la vía de la COX ha sido una de las rutas bioquímicas que más proyectos de investigación ha protagonizado. Además, debe destacarse la gran relevancia clínica que posee, ya que es la diana principal de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), los cuales se han constituido como uno de los agentes farmacológicos más prescritos en todo el mundo en el tratamiento del dolor, fiebre e inflamación, suponiendo una gran fuente de inversión para numerosos laboratorios farmacéuticos.



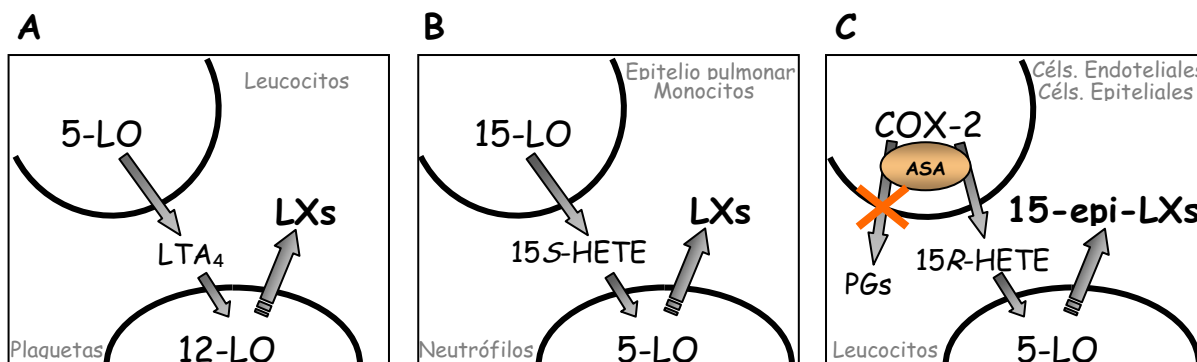
**Figura 1. Metabolismo del ácido araquidónico.** cPLA<sub>2</sub>, fosfolipasa A<sub>2</sub> citosólica; EETs, ácidos epoxieicosatrienoicos; HETEs, ácidos hidroxieicosatrienoicos; LTs, leucotrienos; PGs, prostaglandinas; TX, tromboxano.

Dado el papel protagonista de la COX en el presente proyecto, todos estos aspectos se desarrollan con mayor detalle en capítulos posteriores de esta tesis doctoral.

### 3.- Vía de las lipooxigenasas (LOs):

Las LOs son una familia de enzimas citosólicas que catalizan la oxigenación estereoespecífica de los carbonos 5-, 12-, ó 15- del AA. En humanos existen tres LOs: 5-, 12- y 15-LO. 5-LO transforma el AA en 5-HETE y LTs, mientras que 12- y 15-LOs generan los correspondientes 12- y 15-HETEs, respectivamente (Samuelsson *et al.*, 1987). En mamíferos, gracias al metabolismo intercelular y a las interacciones entre células y entre diferentes LOs (por ejemplo entre la 12- ó la 15- y la 5-LO), se obtiene además un nuevo grupo de

eicosanoides derivados del AA con importantes efectos biológicos: las lipoxinas (LXs) (Samuelsson *et al.*, 1987; Serhan *et al.*, 1996). Además, la interacción entre la ciclooxigenasa-2 (COX-2) acetilada por la aspirina con la 5-LO da lugar a epímeros de las LXs, las 15-epi-LXs (Clària y Serhan, 1995), cuya acción es contraria a la de los LTs y se comportan, por ejemplo, como antagonistas endógenos del efecto proinflamatorio del LTB<sub>4</sub> inhibiendo el efecto vasoconstrictor renal del LTD<sub>4</sub> (Badr *et al.*, 1989; Clària y Serhan, 1995; Samuelsson *et al.*, 1987; Serhan *et al.*, 1996) (ver Figura 2).



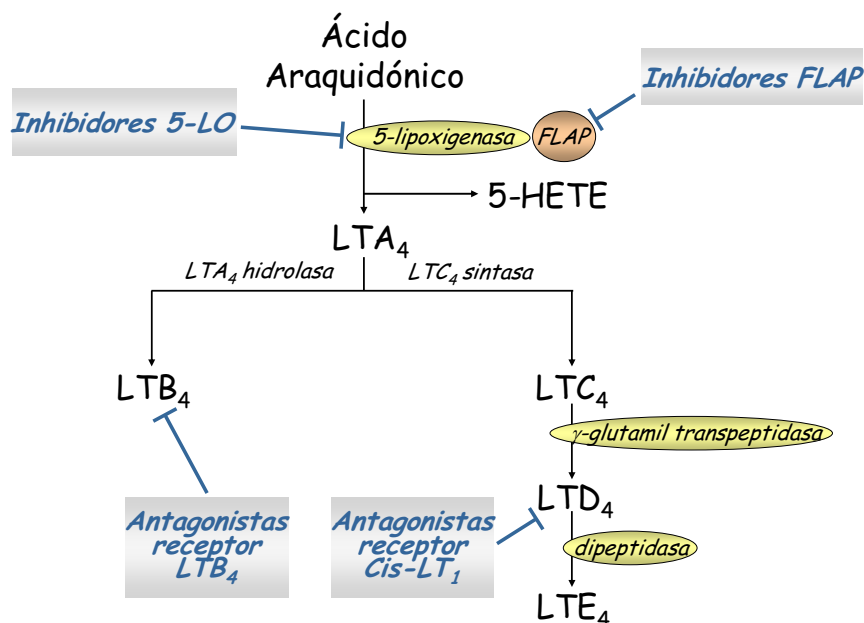
**Figura 2. Biosíntesis transcelular de lipoxinas (LXs).** ASA, ácido acetilsalicílico; COX-2, ciclooxigenasa-2; HETEs, ácidos hidroieicosatetraenoicos; LO, lipooxigenasa; LT, leucotrieno; LXs, lipoxinas; PGs, prostaglandinas. (Figura adaptada de Clària y López-Parra, 2005).

### 3.1.- 5-Lipooxigenasa (5-LO)

La 5-LO es el miembro más importante de la familia de las lipooxigenasas, constituyendo el enzima clave en la biosíntesis de LTs. La 5-LO oxigena al AA libre para formar el 5-HpETE, compuesto que puede ser reducido a 5-HETE por acción de una glutatión peroxidasa, constituyendo un potente agente quimiotáctico y mitogénico, o alternativamente puede ser transformado por la 5-LO en un epóxido altamente inestable: el LTA<sub>4</sub>. (Rouzer *et al.*, 1986, Goetzl y Sun, 1979). Una vez formado, el LTA<sub>4</sub> es rápidamente transformado en LTB<sub>4</sub> por la LTA<sub>4</sub> hidrolasa (Radmark *et al.*, 1984) o bien puede dar lugar al LTC<sub>4</sub> al conjugarse con el glutatión por acción de la LTC<sub>4</sub> sintasa (Lam y Frank, 2000) (Figure 3). Por pérdida sucesiva de residuos aminoacídicos, catalizado por la  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidasa y una dipeptidasa específica de membrana, el LTC<sub>4</sub>, se transforma en LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>, los cuales reciben el nombre de cisteinil-LTs o péptido-LTs.

El LTB<sub>4</sub> es un potente agente inflamatorio, que en neutrófilos estimula la quimiotaxis, la adhesión celular, la producción de ión superóxido y la liberación de enzimas hidrolíticos. Por el contrario, los cisteinil-LTs, que originalmente se identificaron como las

sustancias de reacción lenta liberadas en el curso de las reacciones alérgicas e inmunes (*slow reacting substance of anaphylaxis* o SRS-A), son potentes vasoconstrictores que incrementan la permeabilidad vascular y la secreción de mucus (Lewis *et al.*, 1990; Samuelsson, 1983; Samuelsson *et al.*, 1987). Además el  $LTA_4$  puede también ser metabolizado a lipoxinas (LXs), que son otra familia de mediadores lipídicos (comentado ya anteriormente).



**Figura 3. Vía de la 5-lipoxigenasa.** Enzimas implicados, metabolitos y diferentes estrategias de inhibición farmacológica de la vía. 5-LO, 5-lipoxigenasa;  $cis-LT_1$ , receptor de cisteinil-LTs tipo 1; FLAP, *five lipoxygenase activating protein*; HETE, ácido hidroxicosa-tetraenoico; LT, leucotrieno. (Figura adaptada de Clària y López-Parra, 2005).

El gen de la 5-LO humana se localiza en el cromosoma 10 y está formado por 14 exones y 13 intrones. Su transcripción está regulada por diferentes factores de transcripción que reconocen las regiones reguladoras del promotor, como los miembros de las familias Egr, Sp, NF- $\kappa$ B, GATA, myb y AP (Hoshiko *et al.*, 1990). La 5-LO es una proteína de 674 aminoácidos con un peso molecular aparente entre los 72 y los 80 kDa (revisado en Radmark, 2002). Tras la activación celular, la 5-LO del citoplasma o del núcleo se transloca a la membrana nuclear donde interacciona con la  $PLA_2$  y con la FLAP (*five lipoxygenase activating protein*), que es una proteína residente de 18 kDa que actúa como proteína transferidora del AA, facilitando la unión de éste a la 5-LO. Tanto la translocación de la 5-LO como la unión a la FLAP, son procesos cruciales en la biosíntesis de productos derivados de la 5-LO (Dixon *et al.*, 1990; Peters-Golden y Brock, 2003; Pouliot *et al.*, 1996; Woods *et al.*, 1993).

Los LTs ejercen sus acciones biológicas por la activación de receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Hasta el momento se han clonado dos receptores para el LTB<sub>4</sub> y dos para los cisteinil-LTs (Heise *et al.*, 2000; Lynch *et al.*, 1999; Yokomizo *et al.*, 1997; Yokomizo *et al.*, 2000). El receptor B-LT<sub>1</sub> y el B-LT<sub>2</sub> caracterizado recientemente, reconocen al LTB<sub>4</sub> con alta y baja afinidad respectivamente. El B-LT<sub>1</sub> se localiza principalmente en leucocitos y su activación provoca una marcada respuesta quimiotáctica, mientras que el B-LT<sub>2</sub> se encuentra distribuido de forma generalizada en los diferentes tejidos y su función actualmente es desconocida (Yokomizo *et al.*, 1997; Yokomizo *et al.*, 2000). Además de la unión a estos receptores de membrana, el LTB<sub>4</sub> se une y activa al factor de transcripción nuclear  $\alpha$  activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR $\alpha$ ). Parece ser que por esta vía se estimula la transcripción de enzimas implicados en la inactivación del LTB<sub>4</sub>, jugando un papel importante en el proceso de “aclaramiento” que tiene lugar durante la inflamación. De hecho, en el promotor de la LTB<sub>4</sub>  $\omega$ -hidrolasa se han encontrado varios elementos de respuesta de los PPAR. Además, los ratones deficientes en PPAR $\alpha$ , a los que se les induce un proceso inflamatorio en la oreja mediante AA, presentan una respuesta inflamatoria prolongada (Devchand *et al.*, 1996). Los dos tipos de receptores de los cisteinil-LTs, el Cys-LT<sub>1</sub> y Cys-LT<sub>2</sub>, unen LTC<sub>4</sub> y LTD<sub>4</sub>. El Cys-LT<sub>1</sub> se encuentra en células musculares lisas de las vías respiratorias y en células endoteliales vasculares, y su activación provoca vasoconstricción y adherencia celular (Lynch *et al.*, 1999). El Cys-LT<sub>2</sub> se distribuye por las venas pulmonares, bazo, fibras de Purkinje en el corazón y en la glándula adrenal, y su función permanece desconocida (Heise *et al.*, 2000).

La ruta de la 5-LO para formar LTs está estrechamente involucrada en las reacciones alérgicas e inflamatorias. 5-LO se expresa principalmente en leucocitos polimorfonucleares, eosinófilos, monocitos/macrófagos, mastocitos, células dendríticas y linfocitos B (Romano y Clària, 2003). Por otro lado, los LTs son potentes mediadores de inflamación (para una revisión exhaustiva consultar Romano y Clària, 2003 y Funk, 2001), y su contribución en la patogénia de los desórdenes inflamatorios se ha establecido firmemente en las últimas dos décadas. De hecho la actividad exacerbada de la 5-LO más característica, es la que se produce en el asma y la rinitis alérgica, y por tanto, la inhibición de la vía de la 5-LO en estas condiciones ejerce efectos beneficiosos clínicamente relevantes (Knapp, 1990; Philip *et al.*, 2002). La vía de la 5-LO también está adquiriendo

interés como diana terapéutica en la osteoartritis, en la que un aumento en la formación de  $LTB_4$  parece ser patogénicamente relevante (Abramson, 2004). Además, en la inflamación hepática se ha descrito la sobreexpresión de la 5-LO y un aumento en la producción de cisteinil-LTs en el hígado, condición en la que la inhibición de la vía de la 5-LO se asocia con la ralentización de la progresión de la fibrosis hepática (Titos *et al.*, 2000; Titos *et al.*, 2003). Finalmente, la 5-LO se ha identificado como un gen principal en la susceptibilidad a desarrollar aterosclerosis en ratones (Mehrabian *et al.*, 2002). De hecho, en lesiones escleróticas aórticas, coronarias y carotídeas en humanos, se encuentran sobreexpresados miembros de la vía de las 5-LO, incluyendo la 5-LO, la FLAP, los LTs y sus receptores, la  $LTA_4$  hidrolasa y la  $LTC_4$  sintasa (Spanbroek *et al.*, 2003).

#### • INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA BIOSÍNTESIS DE LTs:

Durante los últimos 20 años, se han desarrollado una serie de agentes farmacológicos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias como asma, colitis ulcerosa, artritis y psoriasis, que modifican la vía de la 5-LO y la biosíntesis de LTs (ver Figura 3).

⇒ En primer lugar se desarrollaron agentes que inhibían directamente la actividad de la 5-LO, pero gran parte de ellos fueron descartados porque provocaban efectos secundarios severos o por no mostrar buena actividad *in vivo*. No obstante en la actualidad se siguen utilizando algunos en experimentación *in vitro* como el AA861 (Ford-Hutchinson *et al.*, 1994). También se desarrollaron moléculas quelantes del hierro activo como inhibidores de la 5-LO, entre las que destacan zileuton, que se comercializa como droga antiasmática con el nombre de *Zyflo*<sup>®</sup> con una  $IC_{50}$  de 0.5-1  $\mu$ M (Carter *et al.*, 1991).

⇒ En los últimos años se han diseñado algunos compuestos para la inflamación cardiovascular que interaccionan con la FLAP, inhibiendo su acción, entre los que destacan MK-886, BAY-X-1005 y MK-0591 (Werz, 2002). Además, el propio gen de la FLAP está adoptando protagonismo en el campo de la cardiología, al detectarse por análisis de ligamiento que el gen que codifica para la FLAP confiere un elevado riesgo de infarto de miocardio y embolia (Helgadottir *et al.*, 2004).

⇒ En cuanto a los antagonistas de los receptores y en particular del receptor Cys- $LT_1$ , los compuestos montelukast (*Singulair*<sup>®</sup>), pranlukast (*Ultair*<sup>®</sup>) y zafirlukast (*Accolate*<sup>®</sup>) se utilizan en la clínica y se ha demostrado que mejoran la función pulmonar y reducen los efectos del asma, especialmente en el asma inducida por ejercicio (Nathan y Kemp, 2001). Además, también ha sido probada la eficacia de los antagonistas del receptor del  $LTB_4$  (SC-41930 o CP-105.696) en diferentes procesos artríticos (Devillier *et al.*, 1999; Drazen *et al.*, 1999).

### 3.2.- 12-Lipooxigenasa (12-LO)

Existen tres isoformas de la 12-LO con diferente secuencia genómica, estructura génica, inmunoreactividad y especificidad por el sustrato, denominadas a partir de la célula



en la que fueron identificadas por primera vez. La forma plaquetaria se designa 12S-LO y transforma el AA en 12S-HETE (Funk *et al.*, 1990), la leucocitaria convierte el AA o el ácido linoleico en 12S-HETE y también en pequeñas cantidades de 15S-HETE (Watanabe *et al.*, 1993) y la epitelial o epidérmica, cataliza la síntesis tanto de 12S- como de 15S-HETE a partir del AA (De Marzo *et al.*, 1992). La isoforma leucocitaria en mamíferos se encuentra ampliamente distribuída entre los diferentes tipos celulares, aunque su distribución tisular varía en función de la especie. Aunque aún se desconoce el papel fisiológico de las 12-LOs, existen algunos estudios que sugieren un importante papel en la liberación de neurotransmisores, oxidación de las LDL y regulación del crecimiento y apoptosis en diferentes tipos de cáncer (Gao *et al.*, 1997; George *et al.*, 2001; Nigam *et al.*, 1999; Sakashita *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 1999). Además, la actividad 12-LO se asocia a anomalías en el territorio vascular ya que tanto los niveles de 12-HETE como los de la 12-LO plaquetaria se encuentran elevados en pacientes con hipertensión esencial (González-Núñez *et al.*, 2001). Recientemente se ha caracterizado en queratinocitos humanos una nueva actividad 12-LO, la 12R-LO, que se encuentra sobreexpresada en diferentes dermatosis proliferativas como la psoriasis, y que es responsable de la síntesis de los productos quirales como por ejemplo el 12R-HETE. Hasta su descubrimiento, se creía que sólo la actividad citocromo P450 era la responsable de la síntesis de estos compuestos (Boeglin *et al.*, 1998).

### **3.3.- 15-Lipooxigenasa (15-LO)**

En humanos se han caracterizado dos isoformas de la 15-LO, cuya expresión se encuentra diferenciada entre tejidos. La 15-LO1 fue descrita originariamente en reticulocitos de conejo, pero también se expresa en otros tipos celulares sanguíneos como neutrófilos, eosinófilos y macrófagos, así como en células del epitelio pulmonar (Nadel *et al.*, 1991; Sigal *et al.*, 1990). La expresión de la 15-LO2, de reciente caracterización, parece estar restringida a pulmón, piel, próstata y córnea, aunque todavía hacen falta más estudios para determinar la localización celular de ésta. Mientras que la 15-LO1 presenta mayor afinidad por el ácido linoléico, parece que la 15-LO2 tiene mayor especificidad por el AA (Brash *et al.*, 1997).

Dado que la isoforma leucocitaria de la 12-LO presenta una elevada homología con la 15-LO1 reticulocitaria, se denominan colectivamente 12/15 LOs (Kuhn y Thiele, 1999).

#### 4.- Isoprostanos:

En 1990, se descubrió una serie de compuestos isoméricos de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , formados a partir del AA por peroxidación mediada por radicales libres. Su síntesis se realiza cuando todavía el AA forma parte de los fosfolípidos de la membrana, y tras su formación, son liberados de ésta por acción de las fosfolipasas (Morrow *et al.*, 1990a; Morrow *et al.*, 1992a). Estos metabolitos, con una vida media muy corta (inferior a 20 minutos), constituyen un marcador excelente de estrés oxidativo, que además se han detectado en todas las muestras y fluidos biológicos testados. Pueden encontrarse en estado libre o en forma esterificada, identificándose esta última en células vasculares musculares lisas, células mesangiales y células epiteliales renales (Klein *et al.*, 1997; Natarajan *et al.*, 1996; Salahudeen *et al.*, 1995).

Se han encontrado niveles elevados de isoprostanos en situaciones en las que se produce estrés oxidativo, como es el caso de la cirrosis y la enfermedad cardiovascular entre otras (ver apartado 4.3 del Capítulo IV) (Morrow *et al.*, 1992a; Natarajan *et al.*, 1996; Salahudeen *et al.*, 1995; Schnackenberg y Wilcox, 1999). Además, en ratas espontáneamente hipertensas y durante la hipertensión inducida por infusión de angiotensina II, también se han observado niveles plasmáticos aumentados (Salahudeen *et al.*, 1995; Schnackenberg y Wilcox, 1999), constatándose además que la administración de un mimético de la superóxido dismutasa reduce la excreción renal de isoprostanos y también la presión sanguínea (Schnackenberg y Wilcox, 1999).

Debido a su posible implicación en las enfermedades cardiovasculares y renales se empezaron a estudiar las acciones hemodinámicas renales de los isoprostanos. Así por ejemplo, se ha visto que los isoprostanos son capaces de reducir el flujo plasmático renal (FPR) y la tasa de filtrado glomerular (FG) mediante la vasoconstricción de la vasculatura preglomerular (Fukunaga *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1992). Además, también se ha demostrado su capacidad de potenciar la respuesta vasoconstrictora a la angiotensina II y a la norepinefrina (Sametz *et al.*, 1999). Los efectos hemodinámicos renales del 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$  son completamente abolidos por los antagonistas del receptor de tromboxano (receptor TP), sugiriéndose por tanto, que las acciones de los isoprostanos pueden estar mediadas

por el receptor TP (Takahashi *et al.*, 1992). Sin embargo, se ha observado que 8-iso-PGF<sub>2α</sub> estimula la síntesis de DNA y la producción de IP<sub>3</sub> por las células musculares vasculares lisas, a una concentración mucho menor que la necesaria para que este isoprostano desplace a los ligandos del receptor TP (Fukunaga *et al.*, 1993; Fukunaga *et al.*, 1997; Pratico *et al.*, 1996b). Además, se ha comprobado que el antagonista del receptor TP bloquea sólo de forma parcial las acciones del 8-iso-PGF<sub>2α</sub> sobre las células vasculares musculares lisas (Fukunaga *et al.*, 1997), por lo que todos estos resultados sugieren que es posible que existan nuevos receptores para los isoprostanos, diferentes de los TP.

### **5.- Vía del citocromo P450:**

El AA puede ser monooxigenado o epoxidado por enzimas de la familia del citocromo P450 (CYP) en el cerebro, riñón, pulmón, hígado y en los vasos sanguíneos. Los metabolitos derivados de esta vía, ácidos 19- y 20-hidroxicicosatetraenoicos (HETEs), ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) y diHETEs, presentan diferentes actividades biológicas según el lugar en el que han sido producidos y además, pueden ser almacenados en la fracción lipídica de los tejidos, para ser liberados posteriormente en respuesta a estímulos hormonales. A pesar de que se ha observado que, en comparación con otros órganos, el hígado es el que más expresión de CYP presenta, y el que está dotado con el mayor número de los diferentes enzimas de la familia involucrados en el metabolismo de ácidos grasos, se dispone de poca información acerca del papel que juegan 19- y 20-HETE y EETs en la función hepática. Sin embargo, en el riñón, el metabolismo del AA constituye una de las actividades CYP más elevadas; la síntesis de HETEs, EETs y diHETEs se produce a lo largo de todo el riñón, pero los metabolitos específicos formados y las cantidades producidas de cada metabolito varían dependiendo del tipo celular y de la isoforma CYP expresada. La producción renal de los diferentes metabolitos de las epoxigenasas e hidroxilasas está regulada por factores paracrinos y hormonales, como la angiotensina II, la endotelina, la hormona paratiroidea, y el EGF (revisado en Imig, 2000). Sin entrar en detalles, merece la pena destacar que se ha demostrado que los metabolitos derivados de esta vía metabólica controlan la hemodinámica renal (Rahman *et al.*, 1997) y la respuesta renal en procesos, como por ejemplo, cambios en la concentración de sales en la dieta.

Como se comentará más adelante (apartado 4.5 del Capítulo IV), estos metabolitos pueden estar involucrados tanto en la patofisiología de la hipertensión portal como en el desarrollo de fallo renal asociado a la cirrosis.

## **II.- COX-1 y COX-2**

La ciclooxigenasa (COX), también conocida como prostaglandina H sintasa o prostaglandina endoperóxido sintasa, es un enzima bifuncional que unido a la membrana, cataliza el paso limitante en la producción de PGs y tromboxano (TX) (Ohki *et al.*, 1979; Smith y Song, 2002). El término “ciclooxigenasa” se adoptó en 1974, después de descubrir que la reacción catalizada por este enzima incluía dos pasos: la ciclación y la oxigenación del AA (ver Figura 5). En 1976 se purificó la isoforma COX-1 (entonces llamada COX simplemente) a partir de vesículas seminales ovinas y bovinas (Hemler y Lands, 1976; Miyamoto *et al.*, 1976), y hasta 1988 no se clonó su gen (DeWitt y Smith, 1988; Merlie *et al.*, 1988; Yokoyama y Tanabe, 1989). Durante muchos años se pensó que esta isoforma constitutivamente activa era la única ciclooxigenasa existente en las células eucariotas, hasta que en 1991 dos laboratorios identificaron de forma independiente la inducible COX-2, a partir de estudios de división celular (Kujubu *et al.*, 1991; Xie *et al.*, 1991). Ahora se sabe que todos los vertebrados estudiados, incluyendo peces cartilagosos, óseos, aves y mamíferos, expresan las dos isoformas de la COX (Jarving *et al.*, 2004).

### **1.- Estructura génica:**

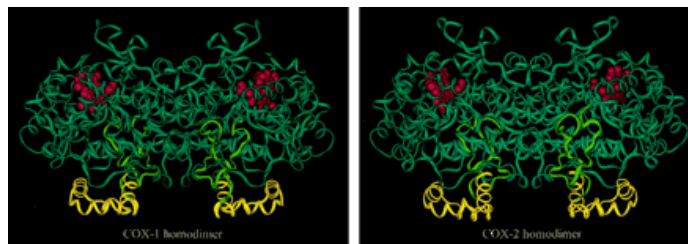
Los genes que codifican para la COX-1 y la COX-2 se encuentran en cromosomas diferentes; el de la COX-1 se localiza en el cromosoma 2 en roedores y en el 9 en humanos, mientras que el de la COX-2 en el cromosoma 1 tanto en ratones como en humanos (Pairet y Engelhardt, 1996). El gen de la COX-1 está formado por 11 exones y abarca una región de 22 kb de DNA genómico, que al transcribirse da lugar a un RNAm de 2.8 kb (Hla y Neilson, 1992; Yokoyama y Tanabe, 1989). El gen de la COX-2, en cambio, está constituido por 10 exones, que representan 8 kb de DNA genómico que, por transcripción, origina tres variantes de RNAm de 4.6, 4.0 y 2.8 kb (Jones *et al.*, 1993; Tanabe y Tohnai, 2002).

En términos generales, el gen de la COX-1 muestra características típicas de los *housekeeping genes* (entre ellas, que no posee *TATA box*), mientras que el de la COX-2 es un gen de respuesta primaria, que posee múltiples lugares que controlan su expresión a nivel transcripcional. En concreto, los análisis de secuencia de la región 5' han revelado la existencia de algunos elementos reguladores de transcripción como una *TATA box*, un motivo NF-IL-6, dos lugares AP-2, tres Sp1, dos NF- $\kappa$ B, un motivo *Cre* y una *E-box* (revisado en Clària, 2003; Tanabe y Tohnai, 2002). En 1996, Ristimaki y colaboradores describieron que la dexametasona *downregulaba* de forma muy rápida la expresión de la COX-2 por desestabilización del RNAm (Ristimaki *et al.*, 1996). El mapeo de la región 3' no traducida (3'-UTR) de la COX-2 había revelado la existencia de lugares de poliadenilación alternativa que daban lugar a dos RNAm diferentes: COX-2<sub>4,6</sub> y COX-2<sub>2,8</sub>, observándose que tras el tratamiento con dexametasona, la isoforma COX-2<sub>4,6</sub> decaía de forma más rápida que la COX-2<sub>2,8</sub>. Appleby y colaboradores describieron que en 3'-UTR del gen de la COX-2 existían múltiples regiones conservadas evolutivamente y 22 copias de motivos AUUUA (Appleby *et al.*, 1994). A raíz de estos hallazgos se sugirió que estos elementos de 3'-UTR cooperaban en la desestabilización del RNAm (Ristimaki *et al.*, 1996).

La expresión del gen de la COX-2 se ve aumentada por mediadores inflamatorios solubles (IL-1 $\alpha$  y  $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ), factores de crecimiento (EGF, PDGF y FGF) y oncogenes (*v-src* y *v-ras*) (Herschman, 1996). Por otra parte, la expresión de COX-2 se encuentra disminuída por antiinflamatorios esteroideos como la dexametasona, la cual, además de reducir la transcripción, también reduce la estabilidad del RNAm de la COX-2 como se ha comentado anteriormente (Newton *et al.*, 1998; Ristimaki *et al.*, 1996). Existen otras formas de represión de la COX-2, como por ejemplo la mediada por glucocorticoides, en las que se puede estar produciendo un descenso en la transcripción mediada por AP-1 y NF- $\kappa$ B (Scheinman *et al.*, 1995). Además, los PPARs son capaces de regular la expresión de la COX-2, reconociendo secuencias PPREs (*PPAR-responsive elements*) que se encuentran en el promotor de su gen, activando su transcripción (Meade *et al.*, 1999). No obstante, también se ha constatado que ciertos ligandos del PPAR $\gamma$  inhiben la inducción de la COX-2 mediada por TPA (12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato) en células epiteliales humanas, y bloquean la expresión mediada por AP-1 y NF- $\kappa$ B (Inoue *et al.*, 2000; Subbaramaiah *et al.*, 2001).

## 2.- Estructura proteica:

COX-1 y COX-2 son proteínas formadas por dos subunidades glicosiladas que, tras su síntesis, se transportan a la superficie luminal de la membrana nuclear y del retículo endoplasmático donde residen (Spencer *et al.*, 1998) (ver Figura 4).



**Figura 4. Estructura cristalográfica de COX-1 (izq.) y COX-2 (der.).** Dominios funcionales: dominio de unión a membrana (amarillo), dominio de dimerización (verde), dominio catalítico (azul) y grupo hemo (rojo). En la parte superior de cada monómero puede apreciarse el lugar activo de la actividad peroxidasa (Figura extraída de Simmons *et al.*, 2004).

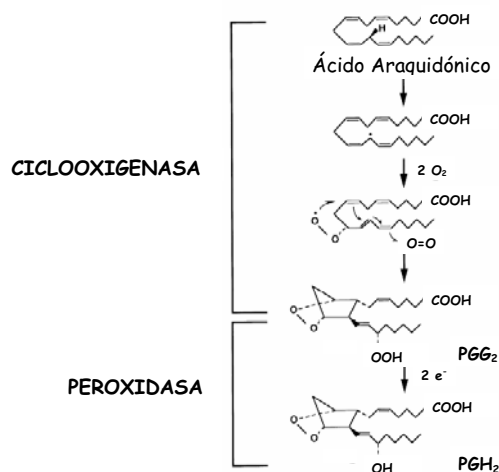
Ambos enzimas presentan una masa molecular muy similar (sobre los 70 kDa), a pesar de que sus proteínas no son tan semejantes, conservando tan sólo un 60% de homología a nivel de aminoácidos. Aunque las dos isoformas catalizan idénticas reacciones y muestran las mismas constantes cinéticas para la conversión del AA en prostanoides, el centro activo de la COX-1 es más pequeño que el de la COX-2, lo cual puede permitir a la COX-2 una mayor selectividad de sustratos diferentes al AA; por ejemplo, COX-2 es más eficiente que COX-1 con el 2-araquidonilglicerol, la anandamida y los ácidos grasos  $\omega$ -3, tales como el eicosapentaenoico (EPA) y el docosahenoico (DHA) (Kozak *et al.*, 2000).

Cada cadena polipeptídica de la COX está organizada en cuatro dominios estructurales: tras el péptido señal que marcaría al polipéptido para ser translocado a la membrana, en la zona amino-terminal, existen dominios con posibilidad de formar puentes disulfuro y con una conformación muy similar al EGF, que constituyen el dominio de dimerización. A continuación encontramos un dominio formado por hélices  $\alpha$  de carácter anfipático. Finalmente, el dominio de mayor tamaño posee una estructura globular donde se sitúa el dominio catalítico, formado por una estructura de hélices  $\alpha$ . Este dominio forma dos lóbulos en la cara interna, en los cuales se localiza el grupo hemo necesario para la actividad peroxidasa (ver Figura 4). El dímero se forma por la interacción de dos dominios de dimerización de cada monómero, de forma que queda un canal hidrofóbico de acceso a los domi-

nios catalíticos. A este canal no solo tienen acceso los sustratos lipídicos, sino también los AINEs. En el canal de acceso de la COX-1 se encuentran algunos residuos interesantes implicados en la actividad enzimática, como la tirosina 385 (Tyr 371 en COX-2) implicada en la actividad ciclooxigenasa, la serina 530, que es el residuo acetilado por aspirina, o la arginina 120 (Arg 104 en la COX-2) que junto con el glutamato 524 son los dos únicos residuos iónicos del canal (Garavito y DeWitt, 1999).

### 3.- Reacciones catalizadas por la COX:

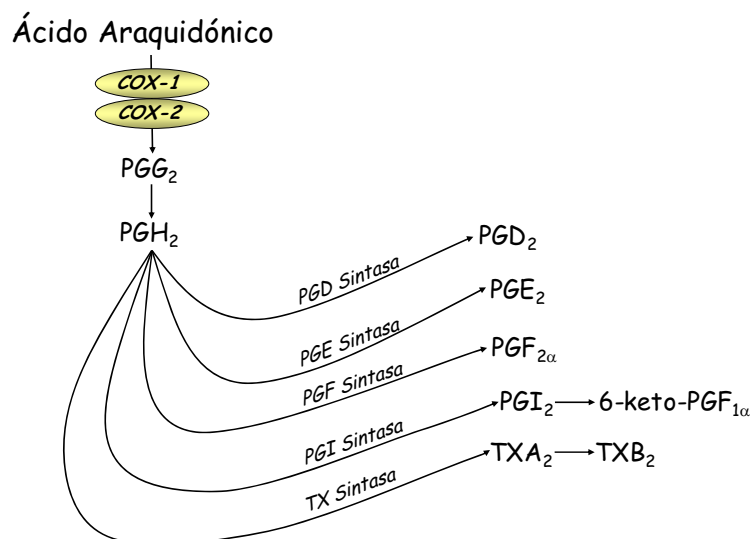
El primer paso en la formación de PGs es la liberación del AA de los fosfolípidos unidos a membrana, normalmente por la acción de la cPLA<sub>2</sub> del grupo IV. Una vez liberado, tanto COX-1 como COX-2 lo transforman en PGG<sub>2</sub> y PGH<sub>2</sub> por idénticas reacciones: de hecho la COX es un enzima dual que añade dos moléculas de oxígeno al AA para formar PGG<sub>2</sub> y después reduce a este hidropéroxido cíclico en el endopéroxido altamente reactivo PGH<sub>2</sub> (ver Figura 5) (Ohki *et al.*, 1979; Smith y Song, 2002), que actúa como sustrato intermediario para la síntesis de PGs de las series E<sub>2</sub>, F<sub>2</sub>, D<sub>2</sub> e I<sub>2</sub> (esta última también llamada prostaciclina) y TXA<sub>2</sub>.



**Figura 5. Reacciones de ciclación y peroxidación de la COX.** Reacciones consecutivas, catalizadas por las ciclooxigenasas o prostaglandinas endoperoxido H sintasas. PGG<sub>2</sub> es reducido a PGH<sub>2</sub>. (Figura extraída de Smith y Song, 2002).

El hecho de que la PGH<sub>2</sub> se transforme en un metabolito o en otro está regulado de forma específica, dependiendo del tipo celular y de las sintasas que éste exprese, de tal manera que cualquier célula formadora de prostanoides, sintetiza uno de ellos mayoritariamente. Por ejemplo, PGH<sub>2</sub> se transforma en PGD<sub>2</sub> en el cerebro y en mastocitos por el

enzima citosólico PGD sintasa. Alternativamente,  $\text{PGH}_2$  puede convertirse en  $\text{PGF}_{2\alpha}$  por la PGF sintasa, que se expresa principalmente en el útero. Las células endoteliales vasculares producen  $\text{PGI}_2$  o prostaciclina a partir de la  $\text{PGH}_2$  mediante la PGI sintasa, y las plaquetas liberan  $\text{TXA}_2$  a partir de la  $\text{PGH}_2$  por la acción de la TX sintasa. Tanto la  $\text{PGI}_2$  como el  $\text{TXA}_2$  tienen una vida media muy corta (30 segundos y 3 minutos, respectivamente) y rápidamente son hidrolizados a los compuestos inactivos 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  y  $\text{TXB}_2$  (Figura 6). Finalmente,  $\text{PGE}_2$  se produce en muchos tipos celulares mediante la PGE sintasa, que en mamíferos existe bajo tres isoformas diferentes: PGES-1m, PGES-1c y PGES-2m. PGES-1m se identificó y caracterizó en 1999 por Jakobsson y colaboradores (Jakobsson *et al.*, 1999), como miembro de la superfamilia de proteínas asociadas a membrana e involucradas en el metabolismo de eicosanoides y de glutatión (*membrane-associated proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism*, MAPEG), y con capacidad de catalizar la conversión de  $\text{PGH}_2$  a  $\text{PGE}_2$ . Más tarde se clonó la PGES-1c, forma citosólica de la PGE sintasa expresada de forma ubicua, que también isomeriza  $\text{PGH}_2$  a  $\text{PGE}_2$ , específicamente en presencia de glutatión (Murakami y Kudo, 2004; Tanioka *et al.*, 2000). Finalmente, en el año 2002 se identificó una segunda isoforma de PGE sintasa asociada a membrana, la PGES-2m (Tanikawa *et al.*, 2002). De entre las tres isoformas, la PGES-1m es la que ha recibido mayor atención porque este enzima es inducible y se encuentra funcionalmente ligado a la isoforma COX-2 (Mancini *et al.*, 2001; Murakami y Kudo, 2004).



**Figura 6. Vía de las ciclooxigenasas (COX).** Ambas isoformas de la COX (COX-1 y COX-2) oxigenan al ácido araquidónico para formar la postaglandina (PG) G<sub>2</sub>, que rápidamente se reduce a PGH<sub>2</sub>, endoperóxido muy inestable que origina los diferentes tipos de PGs por acción de diversas sintasas. (Figura adaptada de Clària y López-Parra, 2005).



#### **4.- Expresión de COX-1 y COX-2:**

Las diferencias más notables entre COX-1 y COX-2 se aprecian a nivel de expresión y distribución tisular, así como en su función celular y fisiológica. Así, la COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos de las diferentes especies animales, incluyendo el sistema gastrointestinal (estómago, duodeno, yeyuno, íleon, colon), hígado, riñón, musculatura lisa vascular y plaquetas (Kargman *et al.*, 1996; Morita, 2002). Aparte de esta expresión constitutiva, se han descrito procesos de inducción en la expresión de la COX-1 en células endoteliales quiescentes y en mastocitos diferenciados (Smith y DeWitt, 1996), pero sin embargo, se desconocen hasta el momento los elementos que regulan esta expresión inducida de la COX-1. En general, la actividad de esta isoforma ha sido relacionada con las funciones homeostáticas de las PGs, como la citoprotección de la mucosa gástrica y el mantenimiento de la función plaquetar y de la perfusión renal. La COX-2, en cambio, en situaciones normales es indetectable en la mayoría de tejidos y células (excepto en el riñón, placenta, cerebro y en las plaquetas de nueva formación, en los que hay una expresión basal constitutiva), pero se *upregula* en respuesta a estímulos proinflamatorios. Debido a ello se ha identificado a esta isoforma como la que posee una expresión inducible, y la que sintetiza las PGs involucradas en procesos de inflamación, mientras que las PGs derivadas de la COX-1 se han considerado responsables de preservar las funciones fisiológicas. En concreto, se ha observado *upregulación* de la COX-2 en presencia de estímulos mitogénicos e inflamatorios como LPS, IL-1, TNF, suero, EGF, ácido retinoico, endotelina, etc... Además, también se encuentra incrementada su expresión en algunas condiciones patológicas: en el riñón durante la restricción de sodio, en adenomas intestinales y tumores de colon, en la microglía de los centros cognitivos en el hipocampo, y en la corteza en casos de Alzheimer (revisado en detalle en Williams *et al.*, 1999).

#### **5.- COX-3:**

Hasta hace prácticamente dos años, la existencia de sólo dos isoformas de la COX (COX-1 y COX-2) no podía explicar las potentes acciones analgésicas y antipiréticas del acetaminofeno (paracetamol). Este compuesto a menudo se clasificaba como un AINE, a pesar de que en la práctica clínica y en modelos animales se había visto que poseía una muy baja actividad antiinflamatoria (Botting, 2000). Ya en 1972, Flower y Vane habían demostrado que el paracetamol inhibía con mayor intensidad la actividad COX en homo-

genados de cerebro de perro que en homogenados de bazo (Flower y Vane, 1972). Esto hizo pensar que existían variantes de la COX con diferente sensibilidad al paracetamol, y que, dado que ni COX-1 ni COX-2 eran estos candidatos, debía haber otro isoenzima sobre el que estuviera actuando el acetaminofeno. No fue hasta el año 2002 que el grupo de Daniel L. Simmons describió la existencia de la COX-3 en la corteza cerebral canina (Chandrasekharan *et al.*, 2002). En este trabajo se sugiere que por *splicing* alternativo, el gen COX-1 canino genera diferentes variantes de RNAm: COX-3, COX-1 y dos COX-1 parciales denominadas proteínas PCOX-1 (PCOX-1a y PCOX-1b). En concreto el RNAm de la COX-3 es idéntico al de COX-1 pero manteniendo el intrón 1; esto supone que, a nivel de proteína, COX-3 presenta una inserción de 30-34 aminoácidos dentro del péptido señal hidrofóbico (ver Figura 7).

#### REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y LA ACTIVIDAD DE LA COX:

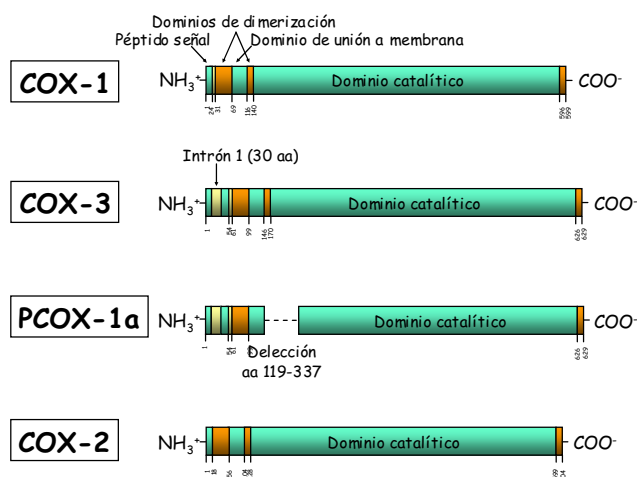
##### 1.- Nivel Transcripcional:

- Elementos en cis: se ha descrito la existencia de *TATA box*, y motivos NF-IL-6, AP-2, Sp1, NF-κB, *Cre* y *E-box* en el promotor del gen de la COX-2 principalmente (aunque también se cree que pueden existir algunos elementos en el promotor de la COX-1).
- Lugares alternativos de *splicing* y poliadenilación: se han descrito diversas variantes de la COX-1 que afectan a la zona codificante del gen y que dan lugar a diferentes isoenzimas (entre ellos, la COX-3, la COX-1 parcial o PCOX-1,...comentadas en Chandrasekharan *et al.*, 2002) (ver Figura 7), y además diferentes transcritos tanto de COX-1 como de COX-2 (Hla, 1996; Ristimaki *et al.*, 1996).
- SNPs: tanto en COX-1 como en COX-2 se han identificado múltiples SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) que pueden dar lugar a una mayor susceptibilidad a padecer diferentes enfermedades (discutido en detalle en Cipollone y Patrono, 2002; Ulrich *et al.*, 2002).

##### 2.- Nivel Postraduccional:

- Glicosilación: tanto COX-1 como COX-2 están glicosiladas, siendo alguna de estas modificaciones esencial para el correcto plegamiento de la COX-1 (Otto *et al.*, 1993), o incluso dando lugar a diferentes formas glicosiladas de la COX-2 que se han asociado con la transformación celular inducida por un virus (Evetts *et al.*, 1993).
- Compuestos endógenos: la COX de nueva síntesis debe activarse mediante la formación del radical tirosil en la Tyr385, por acción de diversos oxidantes (peróxidos lipídicos, peroxinitritos,...) que provocan la oxidación del radical Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>4+</sup>.
- Autoinactivación enzimática: se ha descrito una inactivación de ambas isoformas debida a la generación de especies reactivas que atacan al propio enzima.
- AINEs: todos los AINEs actúan como inhibidores del centro activo de ambas isoformas, aunque los mecanismos sean diferentes para cada AINE.
- Modulación de la actividad ciclooxigenasa y peroxidasa: (todavía en estudio) existen diferentes metabolitos como por ejemplo el NO o diversas proteínas, que pueden unirse a la COX (Simmons *et al.*, 2004) con la finalidad de modificar la V<sub>max</sub> o la K<sub>M</sub> de oxidación del AA, alterar la especificidad del sustrato, canalizar al sustrato entre los dos centros activos, o entre la COX y sus elementos *downstream* de la vía.

En el hombre se ha encontrado COX-3 como un transcrito de 5.2 kb que es más abundante en cerebro y corazón, pero es posible que a nivel de proteína, esta nueva isoforma no sea relevante en humanos, ya que parece que existe un nucleótido de diferencia en el intrón 1 humano con respecto al canino, que hace que se produzca un cambio en la pauta de lectura, pudiendo provocar la imposibilidad de dar lugar a una proteína COX-3 con capacidad catalítica.



**Figura 7. Estructura proteica de las COX.** Diagrama de los dominios funcionales de COX-1 y COX-2 y los efectos del *splicing* alternativo en la inserción del intrón -1 en la COX-3 canina y en la PCOX-1b y deleción de 5 a 8 intrones en la PCOX-1a canina. (Figura adaptada de Simmons *et al.*, 2004).

### III. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EICOSANOIDES DERIVADOS DE LA COX

#### 1.- Productos de la vía de la COX:

En los años 30, las PGs fueron aisladas por vez primera a partir de muestras de semen, próstata y vesículas seminales, destacándose su capacidad para disminuir la presión arterial y producir contractilidad de la musculatura lisa (Goldblatt, 1933; von Euler, 1935). Treinta años después Bergström y Samuelsson establecieron la estructura de las dos primeras PGs que se denominaron PGE y PGF por su respectiva distribución en éter y tampón fosfato, demostrando además que se producían a partir del AA (Bergström *et al.*, 1964). En la actualidad el nombre de “prostaglandinas” engloba diez grupos moleculares específicos, designados por las letras de la A a la J, que se diferencian entre ellos por el grupo funcional que se encuentra en las posiciones 9 y 11 del anillo ciclopentano (Hecker *et al.*, 1995). Ca-

da grupo de PGs está formado por tres series designadas por los números 1, 2 y 3 en forma de subíndice, dependiendo del precursor del que derivan: ácido di-homo- $\gamma$ -linoleico, AA o EPA, respectivamente. Entre las PGs, las más ampliamente distribuidas y estudiadas son las que derivan del AA (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> y PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ). En cuanto a la PGF, el subíndice adicional  $\alpha$  o  $\beta$  hace referencia a la configuración espacial del grupo hidroxilo del carbono 9. En los últimos años han adoptado gran protagonismo las PGs ciclopentenonas, que son un grupo de PGs que resultan de la deshidratación de la PGD<sub>2</sub>. Así por ejemplo se originan compuestos como la PGJ<sub>2</sub>,  $\Delta^{12}$ -PGJ<sub>2</sub>, y 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>), siendo esta última, un ligando para el receptor nuclear PPAR $\gamma$  (Urade y Eguchi, 2002) y comentado en más detalle en capítulos posteriores de esta tesis. También merece una mención especial el TXA<sub>2</sub>, cuya estructura y biosíntesis fue elucidada al poco tiempo de descubrirse las PGs, y que posee una potente actividad vasoconstrictora y proagregante plaquetar (Hecker *et al.*, 1995).

## **2.- Receptores de prostanoïdes:**

De forma similar a lo que ocurre con los elementos *downstream* de la PGH<sub>2</sub> (PG sintasas e isomerasas), los receptores de prostanoïdes son también específicos de célula y de tejido. Por *splicing* alternativo se han identificado al menos 9 receptores de PGs, así como algunas de sus variantes, que pertenecen a la subfamilia de receptores acoplados a proteína G de membrana (GPCR) con siete dominios transmembrana (Funk, 2001). Cuatro de los subtipos de receptores unen PGE<sub>2</sub> (EP1-EP4), dos unen PGD<sub>2</sub> (DP1 y DP2), dos unen PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (FP $\alpha$  y FP $\beta$ ) y uno un PGI<sub>2</sub> (IP) (Funk, 2001). En cuanto al TXA<sub>2</sub>, se sabe que en humanos existen dos receptores, el TP $\alpha$  y el TP $\beta$ , que resultan por *splicing* alternativo del mismo gen (Hirata *et al.*, 1991). Los GPCRs, una vez se han unido a su ligando, se activan y transducen la señal de activación a la proteína G que conferirá especificidad a la señal, dependiendo del tipo de proteína G del que se trate; así, los receptores IP, DP1, EP2 y EP4 están asociados a la activación de proteínas G<sub>s</sub>, y por tanto provocan un aumento en la concentración intracelular de AMPc, mientras que EP1, FP y TP se asocian al incremento en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> mediado por proteína G<sub>q</sub>. De forma excepcional, el receptor EP3 está asociado a la G<sub>i</sub>, causando un descenso en los niveles intracelulares de AMPc.

La clonación y caracterización de estos receptores de prostanoïdes ha facilitado el desarrollo de agonistas y antagonistas sintéticos para cada uno de ellos. De hecho, la mo-

dulación de la vía biosintética de la COX por compuestos que actúan sobre receptores específicos puede ofrecer ventajas sobre los inhibidores que actúan *upstream*. Aunque la industria farmacéutica se ha centrado en este área de investigación, el desarrollo clínico de nuevas drogas es escaso, posiblemente por su complejidad. No obstante, los compuestos desarrollados han resultado ser muy útiles en la caracterización de las actividades biológicas de los receptores de prostanoides y algunos han mostrado también su potencial terapéutico.

#### AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE PROSTANOIDES:

- misoprostol (*Cytotec*®): agonista del receptor EP3 que se usa como un adyuvante a la terapia inhibitoria de la COX para reducir la irritación gástrica y el sangrado.
- fluprostenol (*Travopost*®): agonista del receptor FP comercializado para el tratamiento del glaucoma.
- iloprost (*Ventavis*®): agonista del receptor IP utilizado en la hipertensión pulmonar.
- AA-2114 (*Seratrodist*®) y BAY-U-3405 (*Baynas*®): antagonistas del receptor TX de administración oral, comercializados para el tratamiento del asma (Dogne *et al.*, 2002; Funk, 2001; Narumiya y FitzGerald, 2001).

Además de la señalización mediada por receptores asociados a proteínas G, se ha postulado que las PGs derivadas de ambas isoformas de la COX localizadas en la cubierta nuclear, podrían mediar señales a través de receptores nucleares (Spencer *et al.*, 1998). En este sentido, se ha constatado que ciertos productos de la COX, como la PGJ<sub>2</sub>, 15d-PGJ<sub>2</sub> y PGA<sub>2</sub> pueden activar receptores nucleares de la clase de los PPARs (Forman *et al.*, 1995; Kliewer *et al.*, 1995; Spencer *et al.*, 1998). Asimismo, en estudios recientes se ha demostrado que estos eicosanoides, además de actuar a través de los PPARs, pueden inhibir la actividad de otros elementos nucleares como la kinasa IκB, bloqueando la vía del factor de transcripción NF-κB (Rossi *et al.*, 2000; Spencer *et al.*, 1998). No obstante, dada la importancia que adquiere el PPARγ en el segundo trabajo de esta tesis doctoral, una explicación más detallada de los PPARs, y en particular sobre este subtipo concreto, se realiza en el apartado siguiente.

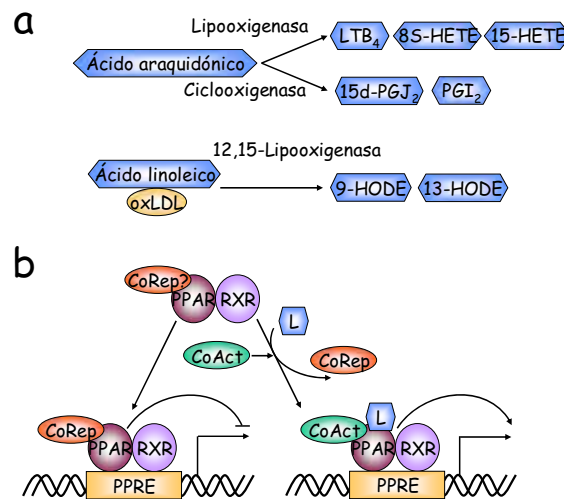
### **2.1.- Receptores nucleares (PPARs). PPARγ**

Los PPARs son factores de transcripción activados por ligando que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares de hormonas, tales como los receptores de hormonas retinoideas, esteroideas y tiroideas (Evans, 1988). Todos los miembros de esta familia presentan una organización estructural similar: una región aminoterminal, que permite la acti-

vación independiente de ligando, seguida de un dominio de unión a DNA (constituído por dos “dedos de zinc”), y en el extremo carboxiterminal un dominio de activación dependiente de ligando (Moras y Gronemeyer, 1998).

Hasta la fecha, se han identificado tres subtipos de PPARs: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  (o PPAR $\delta$ ) y PPAR $\gamma$  que comparten un 60-80% de homología en sus dominios de unión a ligando y al DNA. Las tres isoformas derivan de genes diferentes: el PPAR $\alpha$  humano está localizado en el cromosoma 22, el PPAR $\gamma$  en el cromosoma 3, y el PPAR $\beta$  en el 6. El nombre de PPAR surgió a raíz de la clonación del primer miembro de la familia, el PPAR $\alpha$ , comprobándose que, tras ser activado en hepatocitos de roedores, provocaba la proliferación de los peroxisomas; no obstante, esta respuesta no la produce ni la activación del PPAR $\gamma$  ni del PPAR $\delta$ .

Al contrario que otros receptores nucleares, los PPARs se consideran algo promiscuos, ya que pueden aceptar ligandos de naturaleza muy diferente. Así, pueden ser activados tanto por ligandos naturales (ácidos grasos -AA, EPA-, eicosanoides -8-HETE, 15d-PGJ<sub>2</sub>-, fosfolípidos oxidados,...) como por compuestos sintéticos (ver Figura 8). Entre estos últimos destacan fármacos como los hipotrigliceridémicos (fibratos), que actúan activando el PPAR $\alpha$ , y las tiazolidinedionas (TZDs), una clase de sensibilizadores a la insulina que activan el PPAR $\gamma$ .



**Figura 8. Agonistas naturales y regulación de la actividad transcripcional de los PPARs.**  
 a). Metabolitos de las ciclooxigenasas y lipoxigenasas con capacidad de actuar como agonistas naturales de los PPARs. b). Mecanismos de activación o represión de la transcripción de genes provistos de PPRE (*PPAR-responsive elements*) (Figura tomada de Michalik *et al.*, 2004).

El PPAR activado por unión a su ligando debe formar obligatoriamente un heterodímero con el receptor del ácido 9-cis-retinoico (RXR), adquiriendo entonces la capacidad de actuar como complejo transcripcionalmente activo. Con esta conformación es capaz de reconocer secuencias PPREs (*PPAR-responsive elements*), específicas de los promotores de determinados genes, activando así su transcripción. En general, la activación de los PPARs provoca la transcripción de genes implicados principalmente en el metabolismo lipídico y de la glucosa (adiponectina, acilCoA sintasa, receptor CD36 *scavenger*, fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa,...), así como la *downregulación* de genes proinflamatorios. Se sabe que el complejo PPAR/RXR puede ser activado tanto por ligandos de uno como del otro elemento, y si se unen ambos ligandos a la vez, el efecto activador es sinérgico. En ausencia de ligando, para prevenir la unión de PPAR/RXR al PPRE, se forman complejos de alta afinidad entre el heterodímero inactivo y moléculas co-represoras (ver figura 8b). Al unirse el ligando y activarse, estos co-represores son desplazados y el heterodímero es libre de unirse al PPRE en la zona promotora del gen en cuestión, resultando en activación (“transactivación”) o represión (“transrepresión”) de éste. En el primer caso, para dar lugar a la activación de la transcripción, es necesario que además se produzca reclutamiento de proteínas co-activadoras. Para el caso de la “transrepresión” el heterodímero puede actuar de tres formas diferentes: secuestrando co-activadores, secuestrando factores de transcripción, o bien, inhibiendo la fosforilación y activación de miembros de la familia de las MAP kinasas, necesarias para que se produzca la transcripción (Desvergne y Wahli, 1999).

La distribución tisular varía en función del subtipo: PPAR $\alpha$  se encuentra principalmente en hígado, riñón y músculo esquelético y cardíaco; PPAR $\delta$  se expresa de forma ubicua, mientras que PPAR $\gamma$  se encuentra principalmente en adipocitos y en células del sistema inmune (monocitos/macrófagos, células T y B y células dendríticas). En el riñón, no obstante, se ha encontrado expresión de los tres miembros de la familia (Guan *et al.*, 1997), y en concreto, el PPAR $\gamma$  se expresa en grandes cantidades en células de los túbulos colectores de la médula interna (Guan *et al.*, 1997) y también en células mesangiales (en ratas, Nicholas *et al.*, 2001, y en conejos, Guan *et al.*, 2001). Hay discrepancias sobre si también se expresa en la corteza renal, pero éstas podrían ser debidas a diferencias en la especie estudiada o bien a la metodología empleada (Guan *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 1999a).

Centrándonos exclusivamente en el PPAR $\gamma$  (subtipo estudiado en el segundo trabajo de esta tesis doctoral), se han identificado dos isoformas, PPAR $\gamma$ 1 y  $\gamma$ 2, siendo la  $\gamma$ 1 la que se expresa en muchos tejidos, mientras que  $\gamma$ 2 es exclusiva de adipocitos (Abdelrahman *et al.*, 2005). El PPAR $\gamma$  es activado por una gran variedad de ligandos lipofílicos, como los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y algunos eicosanoides. En concreto, el AA, el ácido gamolénico, el DHA, el EPA, así como los ácidos 12- y 15-HETE y 9- y 13-HODE, unen y activan al PPAR $\gamma$  (Willson *et al.*, 2000). No obstante, el agonista natural por excelencia del PPAR $\gamma$  que ha sido utilizado más en experimentación es la 15d-PGJ<sub>2</sub> (Forman *et al.*, 1995).

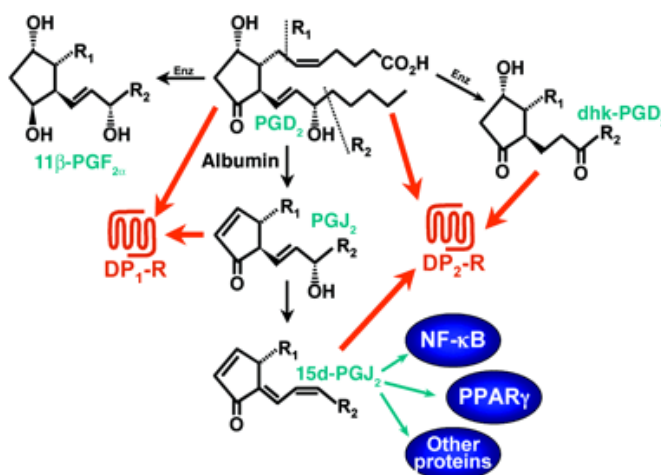
### **2.1.1- 15d-PGJ<sub>2</sub>:**

La 15d-PGJ<sub>2</sub> es una PG con un anillo ciclopentenona, que se descubrió por primera vez en 1983, al incubar a la PGD<sub>2</sub> en presencia de albúmina durante largos periodos de tiempo (Fitzpatrick y Wynalda, 1983) (ver Figura 9). Durante muchos años no se le prestó demasiada atención, hasta que en 1995, dos grupos al mismo tiempo descubrieron que era capaz de activar el PPAR $\gamma$  (Forman *et al.*, 1995; Kliewer *et al.*, 1995). Como hasta el momento se desconocía cuál era el ligando endógeno del PPAR $\gamma$ , estos trabajos fueron muy importantes ya que se hipotetizaba que la 15d-PGJ<sub>2</sub> podía ejercer este rol. Aunque queda perfectamente demostrado por numerosos trabajos que esta PG puede estimular al PPAR $\gamma$ , para que se considere su ligando endógeno, debe actuar a concentraciones consistentes con los niveles fisiológicos. Sin embargo, a diferencia de otras PGs cuya actividad se produce en el rango de nM, hasta el momento las concentraciones reportadas de 15d-PGJ<sub>2</sub> requeridas para activar el PPAR $\gamma$  son del orden de  $\mu$ M (Powell, 2003). Además, habiéndose demostrado que *in vitro* la PGD<sub>2</sub>, por deshidrataciones sucesivas en presencia de albúmina, da lugar a la 15d-PGJ<sub>2</sub>, no hay evidencias de la síntesis enzimática de estas PGs *in vivo*. Utilizando cromatografía líquida altamente sensible acoplada a la espectrometría de masas, Bell-Parikh y colaboradores reportaron que, aunque la 15d-PGJ<sub>2</sub> podía producirse *in vivo*, los niveles sintetizados no eran suficientes para que actuara como ligando endógeno del PPAR $\gamma$  (Bell-Parikh *et al.*, 2003). De hecho, en este trabajo se observó que la 15d-PGJ<sub>2</sub> era un metabolito de la vía de la COX-2, que se detectaba en pequeñas cantidades en la orina humana, pero que no mediaba la maduración de los adipocitos dependiente de PPAR $\gamma$ , ni tampoco se veía alterada su biosíntesis en procesos inflamatorios en humanos, en los cua-



les se había implicado su papel como ligando del PPAR $\gamma$  y modulador de NF- $\kappa$ B. Así, todavía en la actualidad no está claro si la 15d-PGJ $_2$  es un activador endógeno del PPAR $\gamma$  o no, pero lo que sí es evidente es que es su ligando natural más potente identificado hasta el momento y que además es, con mucho, el más utilizado en estudios *in vitro* (Forman *et al.*, 1995).

Al contrario que las PGs convencionales y debido a su anillo ciclopentenona altamente reactivo, la 15d-PGJ $_2$  ejerce potentes acciones inmunomoduladoras y antiinflamatorias (Gilroy *et al.*, 2004), bien sea por mecanismos dependientes de PPAR $\gamma$  (actuando como ligando), bien por mecanismos independientes de éste. En cuanto a las acciones antiinflamatorias independientes del PPAR $\gamma$ , cabe destacar la *downregulación* de la actividad transcripcional del NF- $\kappa$ B (Petrova *et al.*, 1999), la inhibición de la producción de citoquinas en monocitos (Thieringer *et al.*, 2000) y la inhibición de la adhesión de neutrófilos (Vaidya *et al.*, 1999). De hecho, las acciones antiinflamatorias de la 15d-PGJ $_2$  se han asociado con la inhibición directa de enzimas claves de la vía de la COX como la cPLA $_2$ , la COX-2 y la PGE $_2$  sintasa inducible (Quraishi *et al.*, 2002; Tsubouchi *et al.*, 2001).



**Figura 9. Síntesis no enzimática de la 15dPGJ $_2$ .** La 15dPGJ $_2$  se origina a partir de la PGD $_2$  en presencia de albúmina. La 15d-PGJ $_2$  puede ejercer sus acciones por mecanismos dependientes o independientes del PPAR $\gamma$ . (Figura tomada del comentario que se deriva del artículo de Bell-Parikh *et al.*, 2003).

En concreto se ha descrito que las PGs ciclopentenonas suprimen la inflamación crónica y la formación de *pannus* en ratas con artritis adyuvante inducida (Kawahito *et al.*, 2000) y que ejercen un rol protector en modelos de daño renal por isquemia-reperfusión (Chatterjee *et al.*, 2004) y enfermedad inflamatoria intestinal (Cuzzocrea *et al.*, 2003). Es

interesante destacar que en ratas con pleuritis inducida por carragenina, en la cuales la producción de 15d-PGJ<sub>2</sub> tiene lugar durante la fase de resolución, la inhibición de la síntesis de PGs ciclopentenonas se asocia con un proceso inflamatorio exacerbado, mientras que la administración de 15d-PGJ<sub>2</sub> provoca la resolución de la inflamación (Gilroy *et al.*, 1999; Gilroy *et al.*, 2003).

Por tanto, todos estos estudios en diferentes modelos animales de enfermedad indican que la administración de 15d-PGJ<sub>2</sub> podría significar una nueva terapia antiinflamatoria. Para una revisión exhaustiva de todos estos procesos independientes del PPAR $\gamma$  puede consultarse el trabajo de Gilroy *et al.*, 2004.

### ***2.1.2- Efectos terapéuticos de la activación del PPAR $\gamma$***

Tal y como se ha comentado anteriormente, además de los ligandos naturales, se ha observado que determinados compuestos sintéticos también actúan como agonistas del PPAR $\gamma$ . Entre estos, cabe destacar los AINEs como la indometacina o el ibuprofeno, demostrándose que poseen una gran capacidad de actuar como activadores del PPAR $\gamma$  en concentraciones del orden de  $\mu$ M, caracterizándose por tanto otro mecanismo de acción de estos fármacos ampliamente utilizados (Lehmann *et al.*, 1997). No obstante, y dado que la activación del PPAR $\gamma$  se asocia a un efecto hipoglicémico generalizado, la búsqueda de agonistas sintéticos del PPAR $\gamma$  ha adquirido gran importancia en la clínica, principalmente en el tratamiento de la diabetes de tipo II, desarrollándose familias de drogas antidiabéticas del tipo tiazolidinedionas (TZDs) y glitazonas, entre las que se encuentran compuestos como la rosiglitazona, pioglitazona, ciglitazona y troglitazona.

Sin embargo, en los últimos años han surgido estudios en los que se intenta demostrar que los efectos terapéuticos de los agonistas del PPAR $\gamma$  van más allá de su uso en diabetes, adquiriendo importancia en procesos en los que se produce inflamación, shock, fibrosis, proliferación celular masiva o daño por isquemia/reperfusión. En este sentido, la existencia de numerosos estudios en diferentes modelos de inflamación en múltiples órganos y especies, permite concluir que la activación del PPAR $\gamma$  (tanto por 15d-PGJ<sub>2</sub> como por las glitazonas) puede ser útil como terapia en los desórdenes inflamatorios en general, regulando negativamente la expresión de genes proinflamatorios que se inducen durante la diferenciación y activación de los macrófagos (ver mecanismos de “transrepresión” comentados anteriormente). De hecho, se ha visto que el PPAR $\gamma$  se expresa en monocitos

tos/macrófagos humanos y murinos, y que existe una relación entre el grado de activación y diferenciación de estas células y la expresión del PPAR $\gamma$ . De entre los múltiples procesos que se han descrito asociados a este efecto antiinflamatorio destacaríamos entre otros el hecho de que la activación del PPAR $\gamma$  suprime la expresión de COX-2 impidiendo la activación y translocación de NF- $\kappa$ B (Abdelrahman *et al.*, 2005).

En cuanto a su papel en los procesos fibrosos, son múltiples los estudios en los que se ha reportado que la activación del PPAR $\gamma$  ejerce un efecto terapéutico y antifibrogénico en órganos como el riñón (Isshiki *et al.*, 2000) o el hígado (Planagumà *et al.*, 2005).

Respecto a la proliferación celular, también se han publicado numerosos trabajos realizados con diferentes tipos celulares (células mesangiales, células de Kupffer, células de Ito, células musculares lisas,...), en los que se demuestra que la activación del PPAR $\gamma$  inhibe la proliferación celular, bien sea por arresto del ciclo, bien por inducción de apoptosis (Chinetti *et al.*, 1998; Guan *et al.*, 2001; Planagumà *et al.*, 2005).

### **3.- Acciones biológicas de los prostanoides:**

La activación de los receptores de prostanoides dispara diferentes procesos celulares en los distintos tejidos. Dada la gran variedad de acciones que ejercen estos metabolitos, en este apartado se comentaran de forma muy general sólo aquellas actividades más relevantes de las PGs, y que tienen lugar básicamente en el tracto gastrointestinal, el sistema cardiovascular, el sistema respiratorio y renal, el SNC y periférico y los órganos reproductores.

A nivel gastrointestinal se ha descrito un papel citoprotector de las PGs y modulador de las secreciones y motilidad gástrica, que resulta de la combinación de diferentes procesos complejos. Además, debe destacarse que entre los roles más establecidos de las PGs, se encuentra el de participar en el desarrollo de cáncer de colon (muchos de los trabajos publicados al respecto se comentan en Clària, 2003).

En el sistema cardiovascular la acción de los prostanoides se centra sobre todo a nivel de células musculares lisas y plaquetas, donde la PGI<sub>2</sub> presenta acciones contrarias a

las del TXA<sub>2</sub>. Así, en la vasculatura y concretamente en las venas, la PGI<sub>2</sub> promueve principalmente vasodilatación, mientras que el TXA<sub>2</sub> actúa como vasoconstrictor (Hecker *et al.*, 1995). Por otro lado, en cuanto a la agregación plaquetar, TXA<sub>2</sub> la induce mientras que PGI<sub>2</sub> es un potente inhibidor de ésta.

En cuanto al tracto respiratorio, se ha detectado expresión constitutiva de la COX-2 que se ha asociado al control del flujo de sangre pulmonar (Ermert *et al.*, 1998). Además, se ha comprobado que las PGs presentan potentes acciones sobre el tono bronquial y el diámetro de los vasos sanguíneos pulmonares. También se ha descrito cómo la inducción de la COX-2 inhibe la proliferación de células de la musculatura lisa humana, sugiriéndose por tanto un papel protector de este enzima en enfermedades como el asma, en la que en muchos pacientes se ha detectado proliferación excesiva de estas células (Warner y Mitchell, 2004).

En el SNC y periférico se ha descrito expresión constitutiva de la COX-2, y se ha asociado entre otras funciones a la percepción y transmisión del dolor. De ahí que la acción analgésica de los antiinflamatorios pueda explicarse por ambas acciones: inhibición de la producción de metabolitos de la COX-2 a nivel de SNC y a nivel local (Khan *et al.*, 2002).

Respecto a las acciones de las PGs en el sistema reproductor, se sabe que los prostanoïdes son importantes, por ejemplo, para inducir las contracciones uterinas durante el parto, así como en el proceso de ovulación, ruptura adecuada del folículo e implantación del embrión en el endometrio uterino (DuBois *et al.*, 1998). Además se han detectado niveles importantes de algunas PGs en el fluido seminal humano a las que se les atribuye la función de actuar como relajante de la musculatura lisa facilitando la concepción (Samuelsson, 1963).

Sin duda, la acción más relevante de las PGs es su papel en la inflamación, provocando los tres signos principales de este proceso: enrojecimiento, dolor y fiebre. La PGE<sub>2</sub> incrementa la permeabilidad vascular contribuyendo a la extravasación de fluido y la aparición de edema y actuando de forma sinérgica con otros mediadores de inflamación como el complemento, bradiquinina, histamina y LTs (Hecker *et al.*, 1995). Además, la PGE<sub>2</sub> es un potente vasodilatador que incrementa el flujo sanguíneo en el tejido, dando lugar a la aparición del característico eritema (enrojecimiento) (Williams y Peck, 1977).

Por otra parte, la PGE<sub>2</sub> sensibiliza los extremos de los nervios periféricos localizados en el lugar de la inflamación y además actúa en la médula espinal para provocar hiperalgesia (dolor) (Bley *et al.*, 1998; Yamamoto y Nozaki-Taguchi, 1996). Finalmente, la PGE<sub>2</sub> es crucial en la aparición de fiebre (Milton, 1989). La piresis es la consecuencia de unos niveles elevados de PGE<sub>2</sub> en el SNC, secundario a la acción de IL-1 y TNF $\alpha$ , citoquinas proinflamatorias producidas por células inmunes activadas en la circulación sistémica (Ushikubi *et al.*, 1998).

**Tabla 1:** Efectos biológicos de las prostaglandinas (PGs) y el tromboxano (TX).

Sistema	Efectos primarios	Mediador
Sistema reproductor femenino	Acción oxitotónica (contracción uterina)	PGE <sub>2</sub> y PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>
Sistema reproductor masculino	Función eréctil Fertilidad	PGE <sub>2</sub> PGE <sub>2</sub> y PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>
Sistema cardiovascular	Trombosis, agregación plaquetar Incremento de la permeabilidad vascular Inhibición de la agregación plaquetar Vasodilatación arterial Vasoconstricción venosa Mantenimiento del <i>ductus arteriovenosus</i> fetal	TXA <sub>2</sub> TXA <sub>2</sub> PGI <sub>2</sub> PGE <sub>2</sub> y PGI <sub>2</sub> TXA <sub>2</sub> y PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> PGE <sub>2</sub> y PGI <sub>2</sub>
Sistema respiratorio	Vasodilatación bronquial Vasoconstricción bronquial	PGE <sub>2</sub> TXA <sub>2</sub> y PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>
Sistema excretor renal	Estimulación de la liberación de renina Inhibición del efecto hidrosmótico de la ADH Homeostasis: flujo sanguíneo renal y filtrado glomerular	PGE <sub>2</sub> y PGI <sub>2</sub> PGE <sub>2</sub> y PGI <sub>2</sub> PGE <sub>2</sub> y PGI <sub>2</sub>
Sistema gastrointestinal	Protección de la mucosa gástrica	PGE <sub>2</sub>
Sistema nervioso central	Fiebre Sueño Transmisión de dolor	PGE <sub>2</sub> PGD <sub>2</sub> PGE <sub>2</sub> y PGI <sub>2</sub>

No obstante, también se ha descrito la existencia de una actividad antiinflamatoria, mediada por la 15d-PGJ<sub>2</sub> (derivado de la PGD<sub>2</sub> por deshidratación), tanto dependiente como independiente del PPAR $\gamma$  (comentado en detalle anteriormente en el apartado 2.1.1 del capítulo III).

Dado que el objetivo principal de esta tesis es estudiar los efectos renales de la administración de un inhibidor selectivo de la COX-2, las acciones de los prostanoides en el territorio renal, merecen una explicación más extensa, que se desarrolla a continuación.

#### **4.- COX y riñón:**

##### **4.1.- Distribución de COX-1 / COX-2 y de sus metabolitos**

A pesar de que se ha considerado habitualmente a la COX-1 como la isoforma constitutiva y a la COX-2 como la inducible, en el riñón ambas isoformas se expresan de forma constitutiva (Bosch-Marcé *et al.*, 1999; Harris *et al.*, 1994; Jensen y Kurtz, 1997; Khan *et al.*, 1998; O'Neill y Ford-Hutchinson, 1993; Vio *et al.*, 1997). No obstante, la distribución renal de ambas es muy diferente. Así, en humanos, monos, perros, conejos y ratas, COX-1 se expresa preferencialmente en la vasculatura renal y en los túbulos colectores medulares y papilares, mientras que la expresión de COX-2 está limitada a la mácula densa del aparato juxtaglomerular, células epiteliales de la rama gruesa ascendente del asa de Henle y células intersticiales papilares de ratas, conejos y perros (Harris *et al.*, 1994; Jensen y Kurtz, 1997; Khan *et al.*, 1998; Vio *et al.*, 1997, y revisado en Mattix, 2000). En el riñón humano adulto se ha observado expresión de la proteína de la COX-2 en células endoteliales y musculares lisas de arterias y venas y en podocitos intraglomerulares, pero no en células de la mácula densa (Komhoff *et al.*, 1997; Mattix, 2000).

En el riñón, existen diferentes tipos celulares con capacidad de sintetizar PGs. Entre ellos destacan las células epiteliales de los túbulos colectores corticales y medulares, células endoteliales arteriales y musculares lisas, células intersticiales de la médula, células epiteliales de la placa parietal de la cápsula de Bowman y células mesangiales (Mattix, 2000). En cuanto a los metabolitos de la COX sintetizados de forma mayoritaria, la PGE<sub>2</sub> es la principal en la corteza renal en conejos y ratas, mientras que en humanos parece ser la PGI<sub>2</sub>. En la médula, en cambio, y en la mayoría de las especies estudiadas, la PG predominante es la PGE<sub>2</sub>. Al analizar de forma individual cada población celular, se ha demostrado que las células vasculares endoteliales producen de forma mayoritaria PGI<sub>2</sub>, las epiteliales del túbulo y las endoteliales vasculares la PGE<sub>2</sub> y las células mesangiales tanto PGI<sub>2</sub> como PGF<sub>2α</sub> (Mattix, 2000).

##### **4.2.- Acciones biológicas de los productos de la COX en el riñón**

Debido a su rápida degradación las acciones biológicas de las PGs se producen en el propio lugar de síntesis. Así, las PGs sintetizadas en arteriolas y en el glomérulo se considera que regulan la perfusión renal y la tasa de FG, y las producidas por las células del túbulo están involucradas en el mantenimiento de los niveles de sodio y agua.

**• Efectos en la hemodinámica renal**

A pesar de que tanto la PGE<sub>2</sub> como la PGI<sub>2</sub> son potentes vasodilatadores renales (Bolger *et al.*, 1978; Edwards, 1985), en condiciones normales, la contribución de estos productos a la regulación del tono vascular renal es mínima. De hecho, en diferentes trabajos se ha demostrado que la inhibición de la COX no induce ningún cambio en la hemodinámica renal en individuos sanos o ratas euvolélicas anestesiadas (Leehey *et al.*, 1989; Ros *et al.*, 1995; Zipser, 1985). Sin embargo, PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub> son cruciales en el mantenimiento de la función renal en circunstancias en las que se presentan desequilibrios en el volumen sanguíneo efectivo arterial, como por ejemplo en situaciones de dietas bajas en sodio, hipovolemia hemorrágica y condiciones edematosas asociadas a fallo congestivo cardíaco, síndrome nefrótico y cirrosis hepática descompensada. En estas situaciones patológicas, los sistemas vasoconstrictores endógenos – sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), sistema nervioso simpático (SNS) y hormona antidiurética (ADH) - se encuentran sobreactivados y las PGs actúan antagonizando los efectos vasoconstrictores renales de estos compuestos vasoactivos, con la finalidad de preservar la perfusión renal (para una mayor información al respecto consultar el apartado 4.1 del Capítulo IV). Hay numerosas evidencias de que PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub> modulan la acción vasoconstrictora de SRAA, SNS y ADH en células mesangiales, y que en presencia de inhibidores de la COX, las acciones constrictoras de estas hormonas están marcadamente aumentadas en células mesangiales y en el glomérulo (Mene *et al.*, 1989; Schlondorff y Ardaillou, 1986). Además, cabe destacar que la angiotensina II y la norepinefrina, a su vez, estimulan la PLA<sub>2</sub> y aumentan la síntesis de PGs renales (Scharschmidt y Dunn, 1983; Schlondorff y Ardaillou, 1986). En cuanto a los prostanoïdes vasoconstrictores, hay que destacar la PGF<sub>2α</sub> y el TXA<sub>2</sub>. En 1986 se realizó un estudio en riñones aislados de rata, en el que se observó que los análogos del TXA<sub>2</sub> ejercían efectos constrictores en el riñón y que este efecto se acompañaba de una reducción severa de la fracción de filtración (Loutzenhiser *et al.*, 1986).

**• Efectos en el transporte de agua y sal**

Las PGs están claramente involucradas en el transporte renal de sal y agua, mediante la inhibición de la reabsorción de sodio en las células tubulares epiteliales. En el túbulo colector, tanto de ratas como de humanos, es donde se ha detectado un mayor marcaje de la proteína de la COX y es la principal fuente de PGs a lo largo de la nefrona, siendo la PGE<sub>2</sub>

la más abundante (Mattix, 2000). Debido al carácter autacoide de las PGs (comentado anteriormente), y teniendo en cuenta que en el túbulo colector hay un elevado número de receptores de PGs de diferentes tipos, es en este segmento donde el transporte de sodio y solutos está fuertemente regulado por los productos de la COX. Por otro lado, el túbulo proximal y el asa de Henle presentan una limitada capacidad de generar metabolitos de la COX (Bonvalet *et al.*, 1987; Farman *et al.*, 1987). En cuanto a la rama gruesa ascendente del asa de Henle, dos grupos han identificado en el riñón de rata expresión de COX-2 en un subgrupo de células tubulares de este segmento. Además, se dio la casualidad de que estas células también expresaban el cotransportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ , por lo que los autores concluyeron que la COX-2 participaba en el mantenimiento del equilibrio iónico a lo largo del túbulo renal (Harris *et al.*, 1994; Vio *et al.*, 1997). No obstante, estas observaciones no son suficientes para poder extraer consecuencias fisiológicas concluyentes, por lo que se requieren estudios adicionales al respecto.

Las PGs también están involucradas en la respuesta natriurética renal a los diuréticos del asa, considerados como los diuréticos más potentes disponibles en la actualidad. Estas drogas inhiben la reabsorción de sodio en el segmento ascendente del asa de Henle, actuando sobre un sistema de cotransporte específico, el  $\text{Na}^+\text{-2Cl}^-\text{-K}^+$  *carrier* (Puschett, 1981). En un estudio realizado en el año 1988, se observó que estas drogas aumentaban la tasa de FG y el FPR, un efecto mediado por la sobreproducción renal de  $\text{PGE}_2$ , y que el tratamiento con AINEs reducía el efecto vasodilatador renal y la eficacia natriurética de las drogas diuréticas (Chabardes *et al.*, 1988).

Además, de todos los efectos anteriormente citados, parece ser que el transporte de agua en el túbulo colector regulado por ADH es el principal proceso renal en el que participan los productos de la COX (Mattix, 2000). En el túbulo colector, las PGs de la serie E son capaces de antagonizar el efecto hidrosmótico de la ADH, inhibiendo la producción de AMPc mediada por ADH (Chabardes *et al.*, 1988). Asimismo, hay evidencias de que la  $\text{PGE}_2$  puede aumentar la actividad de la proteína kinasa C que eleva los niveles del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, lo que constituye una de las señales que inhibe la reabsorción de agua mediada por ADH en el túbulo colector de la corteza (Ando *et al.*, 1988; Hebert *et al.*, 1990). Por el mismo motivo, cuando se administran inhibidores de la COX a humanos, ratas y perros, el efecto hidrosmótico de la ADH está marcadamente aumentado (Anderson *et al.*, 1975; Berl *et al.*, 1977). Dado que la ADH, a su vez, estimula la síntesis renal de  $\text{PGE}_2$  en células



intersticiales de la medula y la corteza, y en células epiteliales del túbulo colector medular, estos hallazgos indican que la  $PGE_2$  participa en el *feedback* negativo entre los productos derivados de la COX y la ADH.

**Tabla 2:** Metabolitos mayoritarios de la COX en el riñón y sus efectos sobre la función renal.

Mediador	Fuente principal	Efectos primarios
$PGE_2$	Células epiteliales tubulares Células intersticiales	Vasodilatación renal Relajación de las células mesangiales Modulación coeficiente glomerular de ultrafiltración capilar Estimulación liberación renina (en aparato yuxttaglomerular) Antagoniza efecto hidrosmótico ADH (en CETC) Inhibe la reabsorción de cloruro sódico Media la respuesta renal a los diuréticos del Asa
$PGI_2$	Células endoteliales (vasculares y glomerulares)	Vasodilatación renal Relajación de las células mesangiales Estimulación liberación renina (en aparato yuxttaglomerular)
$PGF_{2\alpha}$	Células mesangiales Glomérulo	Contracción de la musculatura lisa
$TXA_2$	Glomérulo	Contracción de la musculatura lisa Contracción de las células mesangiales

CETC: células epiteliales del túbulo colector

## 5.- Inhibidores de la COX:

### 5.1.- Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Los AINEs se han revelado como los fármacos más prescritos en el mundo, utilizándose como potentes agentes analgésicos, antiinflamatorios y antipiréticos desde 1898, año en el que su representante principal, la Aspirina, se comercializó por primera vez (Insel, 1990). En 1971 los grupos de Vane, Smith y Ferreira (Ferreira *et al.*, 1971; Smith y Willis, 1971; Vane, 1971) publicaron sus observaciones sobre la acción antiinflamatoria que los AINEs ejercían inhibiendo la COX y la síntesis de PGs. Los AINEs, debido a sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas, son la base actual del tratamiento de artritis, lesiones articulares y musculoesqueléticas, y dolor e inflamación postoperatorios. También son ampliamente utilizados por sus efectos antitrombóticos, en la prevención de infarto de miocardio y accidentes cerebrovasculares y en los años 90 se ha establecido una asociación clara entre el consumo regular de AINEs (en particular de Aspirina) y una reducción en la incidencia de cáncer de colon y en los desórdenes neurodegenerativos (Bazan *et al.*, 2002; Thun *et al.*, 2002). Desafortunadamente, aparte de estos efectos beneficiosos, estos fármacos también provocan efectos adversos no deseados, principalmente en el tracto gastroin-

testinal, siendo el más común la úlcera gastroduodenal que resulta de la inhibición de la biosíntesis de PGs citoprotectoras (Giercksky, 1989; Lanás *et al.*, 2003).

Tras el descubrimiento de la COX-2, y a partir del momento en que se considera que las PGs derivadas de la COX-1 están presumiblemente involucradas en las funciones de *housekeeping*, y que las derivadas de la COX-2 están implicadas en la inflamación, la gastrotoxicidad asociada a la administración de AINEs tradicionales (aspirina, indometacina, ibuprofeno y meclofenamato) se considera una consecuencia de la inhibición de ambas isoformas. De hecho, actualmente se sabe que la mayoría de los AINEs convencionales tienen un efecto predominante sobre COX-1 y que tan sólo el diclofenaco posee un efecto casi equivalente sobre COX-1 y COX-2. Teniendo en cuenta estos principios, y con el fin de reducir los efectos no deseados de los AINEs, en los años posteriores la estrategia a seguir fue la búsqueda y desarrollo de AINEs que inhibieran únicamente la vía de la COX-2. En primer lugar se logró distinguir de entre los compuestos ya existentes aquellos AINEs con una acción mayor sobre esta isoforma, que se denominaron inhibidores preferentes de la COX-2, entre los que se encontraban etodolac (*Lodine*<sup>®</sup>), meloxicam (*Mobic*<sup>®</sup>) y nimesulide (*Mesulid*<sup>®</sup> y otros), con una menor incidencia de efectos deletéreos, debido a su alta selectividad por esta isoforma.

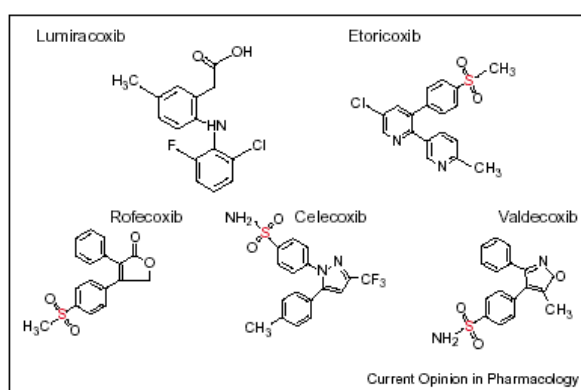
### **5.2.- Inhibidores selectivos de la COX-2 (COXIBs)**

El avance más importante en este campo se produjo cuando las compañías farmacéuticas iniciaron el desarrollo de compuestos específicamente diseñados para inhibir de forma selectiva la COX-2, sin afectar la síntesis de PGs mediada por la COX-1, en todo el rango de dosis utilizado clínicamente (FitzGerald y Patrono, 2001; Seibert *et al.*, 1994).

La primera generación de inhibidores selectivos de la COX-2 desarrollados se demostró que poseía una elevada capacidad selectiva para bloquear la actividad de este enzima *in vitro* y que era tan eficaz como los AINEs convencionales en un número determinado de modelos *in vivo* de inflamación (ratas a las que se les induce edema en la pata con carragenina o bien artritis inducida con adyuvante) e hiperalgesia (hiperalgesia inducida en ratas mediante carragenina) (Anderson *et al.*, 1996; Masferrer *et al.*, 1994; Seibert *et al.*, 1994). A partir de estos resultados se diseñaron los primeros ensayos clínicos para inhibidores selectivos de la COX-2, que fueron suficientes para probar que estos compuestos reducían de forma significativa los síntomas de la osteoartritis y la artritis reumatoide, y aliviaban el dolor

tras la extracción dental, a la vez que se observaba un descenso en la incidencia de úlceras gastrointestinales y erosiones observadas en las terapias con AINEs convencionales (Emery *et al.*, 1999; Lanas, 2002; Malmstrom *et al.*, 1999; Simon *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 1999). Los dos inhibidores selectivos de la COX-2 que primero se aprobaron por la FDA y por la EMEA (*Food and Drug Administration* y *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*, respectivamente) fueron celecoxib (*Celebrex*<sup>®</sup>) y rofecoxib (*Vioxx*<sup>®</sup>), siendo ambos compuestos derivados diarilheterocíclicos, con estructura fenilsulfonamida o fenilsulfona respectivamente, la cual les permite interactuar lenta pero intensamente con el centro activo de la COX-2. En ensayos *in vitro* se demostró que el cociente de inhibición COX-1/COX-2 era de 30 para celecoxib y de 276 para rofecoxib (Patrignani *et al.*, 2005), y que la selectividad era de 7,6 y de 35 para celecoxib y rofecoxib respectivamente.

En los últimos años, se han desarrollado y aprobado los compuestos valdecoxib (*Bextra*<sup>®</sup>), etoricoxib (*Arcoxia*<sup>®</sup>), parecoxib (*Dynastat*<sup>®</sup>) -que es la prodroga de valdecoxib pero inyectable-, y lumiracoxib (*Prexige*<sup>®</sup>), para el tratamiento de la osteoartritis, artritis reumatoide, dismenorrea primaria y dolor postoperatorio, que constituyen una segunda generación de inhibidores COX-2, con una selectividad bioquímica mejorada frente a los COXIBs disponibles hasta el momento (ver Figura 5). *Bextra*<sup>®</sup>, *Arcoxia*<sup>®</sup>, *Dynastat*<sup>®</sup> y *Prexige*<sup>®</sup> fueron aprobados en Europa mientras que sólo *Bextra*<sup>®</sup> está permitido en Estados Unidos. La selectividad de valdecoxib (y parecoxib) y etoricoxib sobre COX-2 es de 30 y 106 veces respectivamente.



**Figura 10. Los COXIBs.** Estructura molecular de los COXIBs desarrollados y aprobados en la clínica. Aunque Rofecoxib ya ha sido retirado, Celecoxib y Valdecoxib permanecen en el mercado. Lumiracoxib y Etoricoxib se encuentran bajo consideración por la FDA. (Figura adaptada de Wong D *et al.*, 2005).

Desde que se introdujeron en el mercado en 1999, los inhibidores COX-2 selectivos se han convertido en una de las clases de fármacos más popular y más ampliamente vendida en el mundo. Desafortunadamente, *Vioxx*<sup>®</sup>, ha sido recientemente retirado del mercado por la propia Merck, porque su uso a largo plazo se ha asociado con una elevada incidencia a desarrollar episodios trombóticos (Bresalier *et al.*, 2005). En concreto, fue a raíz del estudio APPROVe (*Adenomatous Polyp Prevention On Vioxx*<sup>®</sup>), diseñado para determinar el efecto de la droga en adenomas benignos de colon esporádicos, en el que se observó un aumento significativo (un factor de 1.9) en la incidencia de efectos adversos tromboembólicos serios, en comparación con el grupo placebo. En el ensayo VIGOR (*Vioxx*<sup>®</sup> *Gastrointestinal Outcomes Research*) realizado en pacientes con artritis reumatoide, también se reportó que la droga causaba un aumento en el riesgo de padecer infarto de miocardio (un factor de 5), versus al naproxeno en este caso. Datos posteriores derivados de ensayos clínicos controlados han mostrado que otros agentes selectivos de la COX-2 (celecoxib y valdecoxib) pueden estar asociados con un riesgo aumentado de accidentes cardiovasculares serios (infarto de miocardio y embolia), especialmente cuando se usan durante largos periodos de tiempo o en situaciones de riesgo muy elevado (tras cirugía cardíaca). Estudios más recientes han comprobado que no sólo *Celebrex*<sup>®</sup> y *Bextra*<sup>®</sup>, sino también los AINEs convencionales, se asocian con un elevado riesgo cardiovascular (Bennett *et al.*, 2005; Nussmeier *et al.*, 2005). La explicación más extendida y aceptada sobre la causa de estos efectos adversos de los inhibidores selectivos de la COX-2, se basa en que al inhibir la producción de PGI<sub>2</sub> (PG antiagregante sintetizada principalmente por la COX-2), pero no la síntesis de TXA<sub>2</sub> (PG proagregante y vasoconstrictora derivada de COX-1), se produce un desequilibrio a favor de este último, lo que puede provocar una mayor predisposición al infarto de miocardio y embolia.

#### IV.-CIRROSIS HEPÁTICA

##### 1.- Fisiopatología:

La cirrosis hepática es una enfermedad con una elevada prevalencia en el mundo occidental y una de las causas de muerte más frecuente de la población adulta. La cirrosis constituye la fase final de una hepatopatía crónica que se caracteriza histológicamente por

la presencia de una importante alteración de la arquitectura tisular, con la aparición de fibrosis y de nódulos de regeneración y posterior contracción del órgano.

La etiología del proceso cirrótico puede ser muy diversa, pero en nuestra sociedad, la mayoría de casos son consecuencia del abuso de alcohol (40%) y la infección crónica por virus de la hepatitis C (40%) y B (10%). Otras causas menos frecuentes serían la hemocromatosis idiopática, la enfermedad de Wilson, la hepatitis autoinmune, la deficiencia de la  $\alpha 1$  antitripsina y la esteatohepatitis no alcohólica.

Durante el desarrollo del proceso cirrótico el hígado experimenta una serie de cambios histológicos: frente a un daño persistente, en la primera fase del proceso se produce *necrosis hepatocelular*. Esta inducción de muerte celular masiva activa una *respuesta inflamatoria* en el hígado, cuyo objetivo es eliminar el agente causante del daño hepático. Si la inflamación no se resuelve de forma adecuada se desencadenan procesos de regeneración hepática, que en fases posteriores derivan en cambios en la formación, composición y degradación de la matriz extracelular del hígado, dando lugar a la aparición de *fibrosis*. En fases más avanzadas de la enfermedad aparece el cuadro histológico que define a la *cirrosis*, con la completa desestructuración del parénquima hepático, fibrosis severa y presencia de nódulos de regeneración (Erlinger y Benhamou, 1999).

De acuerdo con las complicaciones clínicas que presentan los pacientes, podemos distinguir dos tipos de cirrosis: compensada y descompensada. El término de cirrosis compensada hace referencia a aquellos casos en los que la enfermedad no presenta complicaciones clínicas graves, pudiendo haber sido diagnosticada de forma fortuita en pacientes con síntomas inespecíficos (anorexia, astenia, adelgazamiento,...), o incluso en muchos casos en la autopsia. El pronóstico de la cirrosis compensada es relativamente bueno y en la mayoría de series publicadas la supervivencia a los 5 años es de un 90%, y de un 50% a los 10 años (Ginès *et al.*, 1987). Por otro lado, se considera que los cirróticos compensados se descompensan a razón de un 10% cada año, mientras que la supervivencia de los cirróticos descompensados es de un 20% a los 6 años (D'Amico *et al.*, 1986).

En la actualidad, las estrategias de tratamiento de la cirrosis dependen de la etiología del daño hepático y del grado de evolución de la enfermedad; así, por ejemplo, para los casos de hepatitis alcohólica o debidos a toxicidad farmacológica, se procedería a la elimi-

nación del agente causante, para la hepatitis de origen vírico se administraría interferón, ribavirina o lamivudina, y para los casos de cirrosis muy avanzada el trasplante hepático sería la estrategia a seguir. En este último caso el porcentaje de éxito es muy elevado ya que la tasa de supervivencia postrasplante después de 5 años es del 75% (Iredale, 2003). Sin embargo, debido al grado de severidad que presentan los pacientes en lista de espera de trasplante hepático, y la limitada disponibilidad de órganos, es necesario manejar al enfermo de la forma más adecuada para permitirle llegar con éxito al momento del trasplante. Es por ello que el estudio y conocimiento de las complicaciones de estos pacientes es fundamental.

El desarrollo de diversos modelos experimentales de cirrosis hepática, ha permitido mejorar la comprensión de los trastornos hemodinámicos, renales y neurohormonales que se producen en la cirrosis con ascitis. Los procedimientos más utilizados para inducir cirrosis con ascitis en animales de experimentación son la ligadura del conducto biliar principal, la administración de agentes carcinógenos o el tratamiento con tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) (Clària y Jiménez, 1999). Este último método es, con diferencia, el más utilizado y admite diferentes vías de administración, como la intragástrica, la inhalación y la inyección intramuscular, intraperitoneal o subcutánea (Clària y Jiménez, 1999). En concreto, en nuestro laboratorio utilizamos el método de inhalación de CCl<sub>4</sub> en el interior de una cámara estanca, descrito por McLean y colaboradores (McLean *et al.*, 1969) y modificado por López-Novoa y colaboradores (López-Novoa *et al.*, 1976; López Novoa *et al.*, 1980), que se explica detalladamente en el ANEXO 1 (Material y Métodos) de esta tesis doctoral. Estos animales presentan muchas de las características observadas en los pacientes cirróticos, entre las que destacan la fibrosis hepática, formación de nódulos de regeneración, hipertensión portal, circulación portocolateral, vasodilatación arteriolar esplácnica, disminución de las resistencias vasculares periféricas, hipotensión arterial, incremento del gasto cardíaco, reactividad vascular alterada, hipervolemia, retención de sodio y agua, ascitis, hiponatremia dilucional, hipoosmolalidad, aumento de la actividad del SRAA y del SNS, hipersecreción no osmótica de ADH, incremento de los niveles plasmáticos del factor natriurético atrial y aumento de la excreción urinaria de 6-keto-PGF1 $\alpha$  (Clària y Jiménez, 1992; Jiménez *et al.*, 1992). Los estudios *in vivo* que constituyen la base de esta tesis doctoral se han llevado a cabo en este modelo de cirrosis experimental.

## **2.- Alteraciones hemodinámicas en la cirrosis:**

En la cirrosis una de las consecuencias más relevantes de la pérdida de la estructura normal hepática es la aparición de anomalías circulatorias en los pacientes. Las más características son la *hipertensión portal* y la *circulación hiperdinámica*.

### **2.1.- Hipertensión portal**

La hipertensión portal es la manifestación clínica más frecuente de la cirrosis descompensada, encontrándose en más del 80% de estos pacientes. En condiciones normales, en respuesta a un incremento en el flujo sanguíneo, el hígado responde distensionando el árbol vascular intrahepático, disminuyendo así la resistencia intrahepática. Este mecanismo compensador mantiene el gradiente entre vena porta y cava dentro de los límites normales (1-5 mmHg). No obstante, esto no ocurre en la cirrosis, ya que, debido a los cambios estructurales que tienen lugar en el hígado, se incrementa la resistencia intrahepática al paso del flujo sanguíneo portal, elevándose el gradiente de presión de forma significativa. Cuando el gradiente de presión portal alcanza los valores de 10-12 mmHg -límite establecido para considerar la hipertensión portal como clínicamente significativa (Bosch y García-Pagán, 1999)- pueden empezar a desarrollarse las complicaciones secundarias a la hipertensión portal.

Se ha establecido que los cambios estructurales asociados al daño hepático son responsables en un 70-80% del incremento en la resistencia vascular intrahepática, y que en el 20-30% restante juega un papel clave la vasoconstricción de la microvasculatura intrahepática que tiene lugar durante el proceso cirrótico (Shah, 2001). Tanto en un proceso como en otro parece que las células de Ito (células estrelladas o lipocitos) son fundamentales: estas células son pericitos sinusoidales localizados en el espacio de Disse y que tienen extensiones que rodean las células endoteliales del sinusoides. En condiciones normales, las células de Ito se encuentran en un estado quiescente. Sin embargo, en la cirrosis este tipo celular se activa e incrementa la síntesis de sustancias vasoconstrictoras y profibrogénicas, que actúan de manera autocrina sobre ellas, haciendo que se contraigan y que sinteticen matriz extracelular de forma masiva (Pinzani *et al.*, 1996).

La complicación principal de la hipertensión portal es la aparición de vasos colaterales que derivan la sangre portal a la circulación sistémica, evitando el paso a través del

hígado. Las colaterales portosistémicas más relevantes clínicamente son las varices gastroesofágicas, con un elevado riesgo de sangrado masivo, y que constituyen una complicación muy grave de la hipertensión portal, ya que la mortalidad media en el primer episodio hemorrágico es del 37% (Bosch *et al.*, 2003; Bosch y García-Pagán, 2000).

Aunque la causa inicial de la hipertensión portal en la cirrosis sea el aumento de la resistencia vascular intrahepática, en fases más avanzadas de la enfermedad se produce un aumento del flujo sanguíneo en el sistema venoso portal que mantiene y agrava la hipertensión portal (Vorobioff *et al.*, 1984). Este aumento del flujo portal es consecuencia de una marcada vasodilatación arteriolar que tiene lugar en los órganos del área esplácnica que drenan la vena porta, y que se conoce como síndrome de circulación hiperdinámica.

## **2.2.- Circulación hiperdinámica**

A nivel sistémico, tanto los pacientes como los animales cirróticos, presentan una disfunción circulatoria denominada circulación hiperdinámica, caracterizada por disminución de las resistencias vasculares sistémicas, hipotensión, hipervolemia y aumento del gasto cardíaco. Este síndrome aparece en las fases iniciales de la cirrosis y aumenta de intensidad a medida que avanza la enfermedad hepática (Blendis y Wong, 2001; Moller y Henriksen, 1999).

La causa inicial de este síndrome es la vasodilatación de las arteriolas del área esplácnica, secundaria a la hipertensión portal. Los mecanismos responsables de su desarrollo no están bien establecidos, pero se cree que en su aparición estarían implicados factores vasodilatadores endocrinos que actuarían de manera selectiva en la circulación esplácnica, además de la síntesis local de factores vasodilatadores paracrinos y una disminución de la respuesta a factores vasoconstrictores en esta zona.

La primera consecuencia de esta vasodilatación local del área esplácnica es una vasodilatación arterial sistémica, ya que el volumen sanguíneo no es capaz de llenar el árbol vascular. Durante la primera etapa de esta disfunción circulatoria, cuando aún no ha aparecido ascitis, y para mantener la presión arterial dentro de los límites normales, tienen lugar episodios transitorios de retención renal de sodio y agua, lo que produce un incremento del volumen sanguíneo y del gasto cardíaco. Estos episodios se van agudizando a medida que progresa la enfermedad, hasta que llega a un punto en el que la vasodilatación



esplácica es tan severa que este mecanismo compensador deja de ser suficiente para mantener la homeostasis circulatoria. La presión arterial disminuye causando una disminución del volumen sanguíneo central, provocando la activación de los sistemas vasoconstrictores compensatorios, entre los que encontramos el SNS y los sistemas SRAA y ADH. No obstante, la activación endógena de estos sistemas no mejora los trastornos hemodinámicos, sino que agrava la retención de sodio y agua por el riñón, provocando la aparición de ascitis.

La expresión más extrema del trastorno circulatorio arterial se observa en los pacientes cirróticos con síndrome hepatorenal (ver apartado 3.2 de este capítulo). Estos pacientes presentan hipotensión arterial y frecuencia cardíaca alta a pesar de tener hipervolemia, elevado gasto cardíaco, concentraciones elevadas de renina, noradrenalina y ADH, e intensa vasoconstricción renal, cutánea y muscular.

### **3.- Disfunción renal en la cirrosis. Ascitis:**

Las alteraciones renales de la cirrosis son de carácter funcional, es decir, sin daño histológico (Papper, 1958). De hecho se ha demostrado que cuando los riñones de pacientes cirróticos se transplantan a personas con un hígado sano, no se produce retención de sodio y agua. Además, los pacientes con síndrome hepatorenal transplantados de hígado normalizan en pocas semanas la función renal. Esto sugiere que en la patogenia de estos trastornos estarían implicados mecanismos extrarenales (Arroyo *et al.*, 1999a).

Por orden de aparición, las alteraciones renales más frecuentes que presentan los pacientes cirróticos son la retención de sodio, la retención de agua, aparición de ascitis y la reducción del FG.

#### **3.1.-Retención de sodio y agua**

La retención de sodio es la alteración renal más frecuente en los pacientes cirróticos con ascitis, y juega un papel fundamental en la formación de ascitis y edema. En pacientes cirróticos se desconoce cuál es la cronología entre el deterioro de la excreción renal de sodio y la aparición de ascitis. Sin embargo, en animales de experimentación se demostró que la retención de sodio es causa y no consecuencia de la acumulación de líquido en la

cavidad peritoneal, ya que precede de forma constante a la aparición de ascitis (Jiménez *et al.*, 1985; López Novoa *et al.*, 1980).

A pesar de que se han realizado numerosos estudios para determinar los mecanismos implicados en la patogenia de la retención de sodio en la cirrosis, estos aún se desconocen. Es posible que sea debido al carácter multifactorial del mecanismo que provoca un aumento en la reabsorción de sodio en la cirrosis. En la mayoría de pacientes cirróticos se ha descrito que la retención de sodio se debe a un aumento en la reabsorción tubular de este ión, en presencia de un FG normal o ligeramente reducido (Arroyo *et al.*, 1999b). Otros potenciales mediadores de la retención de sodio pueden ser la activación del SRAA y del SNS, que promueven la reabsorción de sodio en el túbulo proximal (Bernardi *et al.*, 1994; Henriksen y Ringlarsen, 1994).

Debido a que de forma isoosmótica el riñón retiene a la vez sodio y agua, es muy común en los pacientes con cirrosis que la retención de sodio vaya seguida de retención de fluido, manifestación que, de producirse, se asocia con un peor pronóstico de estos pacientes (Arroyo *et al.*, 1994; Ginès *et al.*, 1998).

Son múltiples los estudios llevados a cabo para determinar qué factores participan en la retención de agua en la cirrosis. El principal mecanismo parece ser la hipersecreción no osmótica de la ADH y la inhibición de las PGs renales (Arroyo *et al.*, 1994; Vaamonde, 1996), explicándose este último factor con más detalle en el apartado 4.1 de este capítulo).

Las consecuencias clínicas más evidentes de la retención de agua son la hiponatremia dilucional y la aparición de ascitis. En concreto, la ascitis se produce porque a medida que progresa la cirrosis el paciente se vuelve incapaz de mantener el volumen de líquido extracelular dentro de los límites normales, acumulándose éste en la cavidad intraperitoneal, y desarrollando por tanto la formación de ascitis. Esta complicación de la cirrosis hepática es una de las más frecuentes, manifestándose en el plazo de diez años en un 50% de los pacientes diagnosticados de cirrosis. La probabilidad de supervivencia después de dos años de ser diagnosticada es del 40%, pero el pronóstico es mucho peor en los casos de ascitis refractaria y peritonitis bacteriana espontánea (Moore *et al.*, 2003).

Como ya se ha señalado en los apartados anteriores, esta incapacidad homeostática es consecuencia de las intensas alteraciones a nivel sistémico y esplácnico, relacionadas con la existencia de hipertensión portal, y que determinan trastornos importantes en la función renal, principalmente retención de sodio y agua y vasoconstricción renal (Arroyo y Ginès, 1991).

### 3.2.- Síndrome hepatorenal (SHR)

Es el trastorno renal de aparición más tardía y de mayor severidad en los pacientes cirróticos con ascitis. Se caracteriza por un profundo descenso en el volumen urinario, el FPR y el FG, en ausencia de cambios significativos en la histología renal.

Todavía no es bien conocida la patogénesis de esta vasoconstricción renal pero probablemente pudiera estar causada por los trastornos en la hemodinámica sistémica que provocan el aumento en la actividad de los factores vasoconstrictores, y por una reducción en la actividad de los factores vasodilatadores que se activan para compensar la vasoconstricción renal. Según esta hipótesis, es probable que el SHR esté relacionado con un aumento de la actividad de los sistemas vasoconstrictores renales (SRAA y el SNS), como también de la ADH y de la endotelina, ya que se ha observado que el aumento plasmático de estas sustancias se correlaciona inversamente con el FPR y el FG. Otros factores que también podrían estar involucrados son la adenosina y los eicosanoides, como los cisteinil-LTs y los isoprostanos, con potente acción vasoconstrictora a nivel renal (Llach *et al.*, 1993; Moore *et al.*, 1990; Morrow *et al.*, 1993), como se comenta en el apartado 4.2 de este capítulo. Además, también podría estar implicada una alteración en la síntesis de sustancias vasodilatadoras, como por ejemplo, un descenso en la producción renal de PGs (PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>) (Arroyo *et al.*, 1999a; Arroyo *et al.*, 1986). De hecho, en el contexto de la cirrosis, la perfusión renal y el FG son críticamente dependientes de la producción renal de PGs, y el fallo renal severo puede desarrollarse en esta fase si las PGs renales se inhiben, por ejemplo con antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (Arroyo *et al.*, 1986; Boyer *et al.*, 1979; Planas *et al.*, 1983). Otros factores vasodilatadores que podrían estar implicados son el óxido nítrico (NO) y los péptidos natriuréticos (García-Estañ *et al.*, 1994; Angeli *et al.*, 1994).

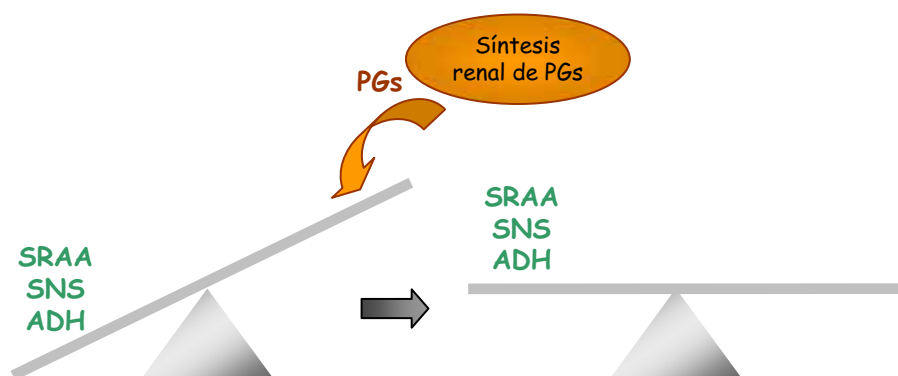
#### **4.- Papel de los eicosanoides en la disfunción renal:**

##### **4.1- Prostaglandinas**

Tal y como se ha comentado con anterioridad, en los apartados 4.2 del capítulo III y 3.2 del capítulo IV, en la cirrosis las PGs juegan un papel clave en el mantenimiento de la perfusión renal. De hecho, la síntesis renal de PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>, estimadas mediante la excreción urinaria de PGE<sub>2</sub> y 6-keto-PGF<sub>1α</sub> respectivamente, está marcadamente aumentada en pacientes con cirrosis y ascitis, en comparación con pacientes con cirrosis compensada (sin ascitis) y sujetos normales (Arroyo *et al.*, 1983; Arroyo *et al.*, 1986; Dunn, 1984; Rimola *et al.*, 1986). Dado que las PGs antagonizan el efecto vascular y tubular del SNS, de la angiotensina II y de la norepinefrina circulante, el aumento en la síntesis de PGs que se produce en la cirrosis se considera una respuesta homeostática para preservar y proteger al riñón de los efectos deletéreos de la exacerbada actividad de los sistemas vasoconstrictores endógenos (ver Figura 11). En pacientes cirróticos, las PGs también juegan un papel importante en modular la respuesta renal a los diuréticos del asa (Planas *et al.*, 1983) y en la regulación del metabolismo renal del agua, contrarestando el efecto hidroósmótico de la ADH mediante la inhibición de la reabsorción masiva de agua (Pérez Ayuso *et al.*, 1984). Cuando la severidad de la enfermedad se hace más acusada y los pacientes desarrollan SHR avanzado, se ha observado una reducida síntesis renal de PGs vasodilatadoras. La causa de esta disminución no se conoce completamente, pero se ha relacionado con la existencia de una actividad COX reducida (Govindarajan *et al.*, 1987). Esta deficiencia de PGs renales, inclina el delicado balance que se produce en el riñón de pacientes cirróticos hacia la vasoconstricción, disminuyéndose la tasa de FG y el FPR y aumentando la retención de sodio y agua (Ginès y Rodés, 1999) (Figura 11). Desafortunadamente, la administración i.v. de PGE<sub>2</sub> o la administración oral de misoprostol (análogo de la PGE<sub>1</sub>), no mejora la función renal en pacientes con cirrosis y ascitis o fallo renal (Ginès *et al.*, 1993).

Estas acciones de las PGs se han podido estudiar también en el modelo de cirrosis experimental en ratas inducido por inhalación de CCl<sub>4</sub>, que como ya se ha comentado anteriormente, ha sido ampliamente estudiado por presentar muchas de las disfunciones que se producen en la cirrosis humana. Estos animales, además de desarrollar hipertensión portal y anormalidades a nivel sistémico (hipotensión, elevado gasto cardíaco y reducción de las resistencias vasculares periféricas), desarrollan retención de sodio y agua como consecuencia de una actividad aumentada de los sistemas SRAA, SNS e hipersección no osmótica de

la ADH (Clària y Jiménez, 1999; Jiménez *et al.*, 1992). Además, se ha podido demostrar que presentan sobreactividad de la cPLA<sub>2</sub> y, de forma similar a lo que ocurre en pacientes, presentan una síntesis elevada de PGs vasodilatadoras (Clària *et al.*, 1992; Niederberger *et al.*, 1998; Ros *et al.*, 1995; Solà *et al.*, 1988). Solà y colaboradores encontraron una relación temporal entre la retención de sodio, la activación del SRAA y la excreción urinaria de 6-keto-PGF<sub>1α</sub> (metabolito estable de la PGI<sub>2</sub>) en ratas inducidas a cirrosis. También, se ha descrito una relación entre las PGs y el óxido nítrico en el riñón de ratas cirróticas tratadas con CCl<sub>4</sub> y en ratas con ligadura crónica del conducto biliar, demostrándose de esta manera que en estos modelos animales de cirrosis, ambos sistemas están operativos y son de una importancia crítica en el mantenimiento de la función renal dentro de los límites normales (Criado *et al.*, 1999; Ros *et al.*, 1995).



**Figura 11. Papel de las PGs en el mantenimiento de la función renal en la cirrosis.**

La síntesis aumentada de PGs renales en la cirrosis es una respuesta homeostática para preservar y proteger a los riñones de los efectos deletéreos de la exacerbada actividad de los sistemas vasoconstrictores endógenos (RAAS, SNS y ADH). Una síntesis renal disminuida de PGs inclina el delicado balance hacia la vasoconstricción y el paciente cirrótico desarrolla fallo renal (SHR). ADH: hormona antidiurética; RAAS: sistema renina-angiotensina-aldosterona; SHR: síndrome hepatorenal; SNS: sistema nervioso simpático.

#### 4.1.1.- AINEs e insuficiencia renal en la cirrosis:

El uso de AINEs ha permitido elucidar la prueba concluyente del papel crítico que desempeñan las PGs en el mantenimiento de la función renal en la cirrosis descompensada. En este sentido, la inhibición aguda de la síntesis de PGs mediante la administración de AINEs (indometacina, ibuprofeno, naproxeno, sulindaco ó aspirina) en pacientes con cirrosis y ascitis se asocia a un descenso significativo del FPR, la tasa de FG, el volumen urinario y la excreción de sodio (Arroyo *et al.*, 1983; Boyer *et al.*, 1979; Brater *et al.*, 1987; Dunn, 1984; Quintero *et al.*, 1986). Los pacientes que en plasma presentan elevada actividad de renina y concentraciones elevadas de norepinefrina son especialmente sensibles a

estos efectos adversos, mientras que los pacientes con cirrosis compensada e individuos sanos no ven alterada su función renal por la administración de AINEs (Arroyo *et al.*, 1983). Cabe destacar que este deterioro en la función renal asociado al uso de AINEs se observa rápidamente después de la administración de la droga, y que la reversión también se produce de forma rápida tras la supresión del tratamiento. Además, también se ha observado que la inhibición de las PGs con aspirina, naproxeno, indometacina o sulindaco suprime el efecto hemodinámico renal y reduce las acciones diuréticas y natriuréticas de la furosemida y la espironolactona en pacientes con cirrosis y ascitis (Planas *et al.*, 1983). Finalmente, hay que destacar también que la inhibición aguda de las PGs con aspirina en pacientes con cirrosis, ascitis y niveles plasmáticos elevados de ADH se asocia con una reducción significativa en la capacidad renal de excretar agua libre, estimada como el aclaramiento de agua libre tras una carga oral de 20 ml/kg por masa corporal (Pérez Ayuso *et al.*, 1984). Como consecuencia de todos estos hallazgos, en la práctica clínica, el tratamiento con AINEs durante periodos prolongados está contraindicado en pacientes con cirrosis descompensada, debido al elevado riesgo de provocar el desarrollo de fallo renal y ascitis refractaria.

De forma similar a lo que ocurre en humanos, la inhibición de la síntesis de PGs mediante el uso de AINEs (indometacina, aspirina) en ratas cirróticas empeora el FPR y la tasa de FG, efecto que no se observa en animales control (Leehey *et al.*, 1989; Ros *et al.*, 1995).

#### **4.2- Tromboxano**

En cuanto al TXA<sub>2</sub>, dado su potencial vasoconstrictor, se ha pensado que puede estar involucrado en el desarrollo del fallo renal en la cirrosis. De hecho, se demostró que la excreción urinaria de su metabolito estable, el TXB<sub>2</sub>, se encontraba aumentada en pacientes y en animales de experimentación con cirrosis (Rimola *et al.*, 1986; Solà *et al.*, 1988). Sin embargo, la administración de inhibidores del TXA<sub>2</sub>, tanto a pacientes como a ratas cirróticas, no se asoció con ningún efecto beneficioso en la circulación renal. A pesar de que en estudios realizados en los últimos años se ha observado que un inhibidor de la TX sintasa aumenta la respuesta natriurética de la furosemida en pacientes no azotémicos con cirrosis y ascitis, y que un antagonista del receptor de TX mejora la excreción de agua en un grupo de cirróticos, sin afectar la hemodinámica renal ni la excreción de sodio, toda-

vía existen controversias sobre el papel principal que desempeña el TXA<sub>2</sub> en inducir fallo renal en la cirrosis (Gentilini *et al.*, 1988; Laffi *et al.*, 1992; Pinzani *et al.*, 1988).

#### 4.3.- Isoprostanos

Otros de los eicosanoides destacados por su posible implicación en el desarrollo de fallo renal asociado a la cirrosis son los isoprostanos. En un primer estudio se observó que la administración de CCl<sub>4</sub> en ratas provocaba un aumento notable en los niveles hepáticos y renales de isoprostanos esterificados (Morrow *et al.*, 1992b), y además era en estos tejidos donde se localizaba el estrés oxidativo producido. En un trabajo en el que colaboraban los grupos de Moore, Roberts y Morrow, se detectaron por vez primera niveles elevados de isoprostanos en el plasma de pacientes con SHR (Morrow *et al.*, 1993). Además, la infusión de superóxido dismutasa a tres de estos pacientes redujo en un 50% los niveles plasmáticos de isoprostanos. Aunque se desconoce la relación causa-efecto entre niveles elevados de isoprostanos y aparición de SHR, se ha podido observar un efecto vasoconstrictor en la vasculatura renal mediado por los isoprostanos (Morrow *et al.*, 1990b). Además, muchos de los isoprostanos pueden mediar sus acciones vía endotelina-1, tal y como se demostró en el trabajo de Yura y colaboradores (Yura *et al.*, 1999), en el que se constató que concentraciones fisiológicas de 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, podían estimular la proliferación celular, la síntesis de DNA y la expresión del RNAm de la endotelina-1 en células endoteliales aórticas bovinas. Este efecto proliferativo fue parcialmente abolido con el tratamiento con un anticuerpo antiendotelina. Esto puede extrapolarse a los pacientes con SHR ya que las concentraciones plasmáticas de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> y de endotelina-1 están aumentadas de forma significativa (Morrow *et al.*, 1993; Moore *et al.*, 1992), aunque no hay datos que permitan concluir si los niveles elevados de isoprostanos circulantes inducen directamente un aumento en la síntesis de endotelina-1.

#### 4.4.- Leucotrienos

A partir de diferentes evidencias, se ha sugerido que los cisteinil-LTs también podrían estar implicados en el desarrollo del SHR. Esta idea deriva de la observación de que la administración i. v. de LTC<sub>4</sub> a ratas normales indujo contracción mesangial y descenso en el FPR y en la tasa de FG, efecto que se revirtió con la coadministración de un antagonista específico (Badr *et al.*, 1984). En 1989, Huber y sus colaboradores observaron que la tasa de excreción urinaria de LTE<sub>4</sub> era mucho mayor en pacientes con SHR que en individuos sanos o cirróticos sin SHR (Huber *et al.*, 1989). Estos hallazgos fueron confirmados

por el grupo de Moore (Moore *et al.*, 1990) al observar que la excreción de  $\text{LTE}_4$  corregida por el aclaramiento de creatinina era dramáticamente superior en pacientes con SHR que en individuos sanos, pacientes con cirrosis compensada y descompensada, disfunción hepática severa y fallo renal crónico. Además, al infundir  $^3\text{H}$ -  $\text{LTC}_4$  a dos individuos sanos y uno con SHR, se observó que el aclaramiento renal de  $\text{LTE}_4$  empeoró en el caso de SHR. A pesar de detectar una reducción en el aclaramiento renal, los niveles elevados de cisteinil-LTs encontrados en el SHR sugieren que la síntesis de estos metabolitos se encuentra aumentada en estos pacientes. No obstante, todavía no se conoce cuál es el origen de esta hipersecreción de cisteinil-LTs en el SHR. Por los datos del trabajo de Uemura y colaboradores (Uemura *et al.*, 1994), en el que se estableció una correlación entre la excreción urinaria de cisteinil-LTs y la severidad de la enfermedad hepática, se puede deducir que debido al daño hepático, se reduce la masa funcional de este órgano, y por tanto, el metabolismo de cisteinil-LTs que se produce normalmente en el hígado, es sustituido por el renal. No obstante, no puede descartarse tampoco que la causa de esta hipersecreción de cisteinil-LTs sea un aumento de su síntesis en el territorio renal.

#### **4.5.- Otros eicosanoides**

Finalmente, dentro del contexto del SHR, hay que destacar también a los eicosanoides derivados del CYP como posibles implicados. Se ha observado que en pacientes cirróticos la excreción urinaria de 20-HETE, un potente vasoconstrictor renal, se encuentra significativamente aumentada, y que el aumento se relaciona con la severidad de la enfermedad y con el descenso en el FPR. En estos pacientes además, la excreción urinaria de 20-HETE es mucho más elevada que la de PGs y  $\text{TXB}_2$ , mientras que en individuos normales 20-HETE y PGs se excretan a niveles similares (Sacerdoti *et al.*, 1997).



# Objetivos



En la cirrosis descompensada, la síntesis renal de PGs, juega un papel clave en el mantenimiento de la función renal. En concreto, en esta patología se produce una disfunción en el sistema circulatorio, caracterizada por la aparición de hipotensión arterial y reducción de las resistencias vasculares sistémicas, lo que provoca la activación de los sistemas vasoactivos endógenos (SRAA, SNS y ADH). En consecuencia, y para preservar la función renal, es fundamental que las PGs renales contrarresten la exacerbada actividad vasoconstrictora de estos sistemas. Además, se ha observado que en pacientes cirróticos las PGs juegan un papel importante en la modulación de la respuesta renal a los diuréticos del asa y en la regulación del metabolismo renal del agua, antagonizando el efecto hidrosmótico de la ADH. De hecho, se ha podido observar que en estos pacientes la inhibición aguda de las PGs con AINEs se asocia a un empeoramiento significativo en la hemodinámica renal, la excreción de sodio, la excreción de agua libre y la respuesta renal a la furosemida y a la espironolactona, por lo que en la práctica clínica los pacientes con cirrosis y ascitis no pueden recibir tratamientos prolongados con AINEs, debido al elevado riesgo de desarrollar fallo renal y ascitis refractaria.

A pesar de que el papel de las PGs en el mantenimiento de la función renal en la cirrosis está bien establecido, en los últimos años, con la identificación de dos isoformas de la COX, han surgido nuevas incógnitas, como por ejemplo determinar qué isoforma de la COX es la responsable de la síntesis de PGs involucradas en la homeostasis renal en esta enfermedad, así como caracterizar el efecto de los nuevos inhibidores selectivos de la COX-2, y especialmente si su uso puede o no causar efectos deletéreos renales en la cirrosis con ascitis. Por todo ello, los objetivos del presente estudio fueron:

- I. Caracterizar la expresión y distribución renal de COX-1 y COX-2 en ratas control y cirróticas.
- II. Comparar los efectos producidos por la administración de un inhibidor selectivo COX-1 (SC-560), con los de un inhibidor selectivo COX-2 (celecoxib), sobre la función renal, respuesta diurética y natriurética a la furosemida y metabolismo del agua, en ratas con cirrosis y ascitis.
- III. Investigar, *in vitro*, los mecanismos de acción de celecoxib en células renales, evaluando los efectos de celecoxib sobre la biosíntesis de eicosanoides vasoac-

tivos, la liberación de renina, la activación de PPAR $\gamma$  y la expresión de  $\alpha$ -SMA en células mesangiales de rata.

- IV. Establecer si la albúmina, utilizada en la clínica como expansor plasmático en esta patología, modula las acciones moleculares de celecoxib en esta línea celular.

# Resultados



**Artículo 1: Las prostaglandinas derivadas de la ciclooxigenasa-1 están involucradas en el mantenimiento de la función renal en ratas con cirrosis y ascitis.**

Aunque el papel de las PGs en el mantenimiento de la función renal en la cirrosis era bien conocido, en el momento en el que se inició este estudio, se desconocía cuál era la isoforma de la COX (COX-1 o COX-2) responsable de la síntesis de las PGs involucradas en la homeostasis renal en esta enfermedad. En este primer trabajo, realizado en el modelo de cirrosis experimental en ratas inducido mediante inhalación de CCl<sub>4</sub>, se caracterizó a nivel de proteína la expresión y distribución renal de COX-1 y COX-2. Además, se realizaron estudios funcionales en 88 ratas con cirrosis y ascitis, en los que se evaluaron los efectos del placebo, un inhibidor selectivo de la COX-1 (SC-560) y un inhibidor selectivo de la COX-2 (celecoxib), sobre el volumen urinario (V), la excreción urinaria de sodio (U<sub>Na</sub>V) y PGE<sub>2</sub> (U<sub>PGE2</sub>V), la tasa de filtrado glomerular (tasa de FG), el flujo plasmático renal (FPR), la respuesta diurética y natriurética a la furosemida y el metabolismo del agua. Los resultados del estudio se resumen a continuación:

1. Existe una expresión constitutiva tanto de COX-1 como de COX-2 en el riñón de ratas control y cirróticas, pero sólo COX-2 se sobreexpresa en los animales cirróticos con ascitis.

En primer lugar se analizó por Western Blot la expresión de las proteínas COX-1 y COX-2 en el riñón de ratas control y de ratas cirróticas con ascitis. Ambas isoformas se encontraron constitutivamente expresadas en el tejido renal, tanto de animales control como de cirróticos. Sin embargo, se observó que, mientras que los niveles de COX-1 se mantenían inalterados, la expresión de COX-2 aumentaba significativamente en los riñones de animales cirróticos con ascitis en comparación con los de los animales control.

Para determinar su distribución renal, en estos tejidos también se realizó la inmunohistoquímica de ambas isoformas. En concreto, se observó inmunoreactividad para la COX-1 en los túbulos colectores, vasculatura renal, y células papilares intersticiales, siendo su expresión particularmente intensa en los túbulos colectores papilares, y de baja a moderada en los túbulos colectores corticales. Por otro lado, la inmunoreactividad positiva para la COX-2 se localizó en la mácula densa y en los túbulos colectores de la médula externa.

2. A pesar de que ambos redujeron la  $U_{PGE_2}V$  de forma similar, Celecoxib, a diferencia de SC-560, preservó la hemodinámica renal y la función renal en ratas cirróticas con ascitis.

Para evaluar los efectos renales de la inhibición selectiva de ambas isoformas, se realizó la determinación de diferentes parámetros de función renal en ratas con cirrosis y ascitis, a las que se les había administrado de forma i.v. celecoxib (20 mg/kg), SC-560 (20 mg/kg) o placebo.

La administración i.v. del inhibidor selectivo de la COX-1, SC-560, produjo un descenso significativo en  $V$ ,  $U_{Na}V$ , tasa de FG y FPR. Este empeoramiento en la función renal se manifestó enseguida (a los 20 minutos de la administración), experimentando en todos los parámetros un declive progresivo a lo largo de todo el periodo de estudio, excepto en  $U_{Na}V$ , que a los 40 minutos alcanzó un valor máximo *plateau*. En cambio, los efectos renales asociados a la administración i.v. de celecoxib fueron similares a los producidos por placebo, excepto que a los 60 minutos de la administración provocó un descenso significativo en el  $V$ . No obstante, este cambio fue transitorio ya que a los 80 minutos se restableció, alcanzando valores que no diferían de los del grupo placebo.

Cabe destacar que la administración de SC-560 y celecoxib a los animales cirróticos se asoció con un descenso en la inhibición de la  $U_{PGE_2}V$  del 48 y el 47%, respectivamente.

3. Celecoxib, a diferencia de SC-560, no alteró la eficacia diurética y natriurética de la furosemida en ratas cirróticas con ascitis.

La inyección de furosemida (5 mg/kg) a ratas cirróticas tratadas con el inhibidor selectivo de la COX-1, SC-560, se asoció con una reducción en la respuesta diurética y natriurética de esta droga. En cambio, celecoxib no afectó a la eficacia diurética y natriurética de la furosemida. En consecuencia, las ratas que recibieron SC-560, mostraron una marcada reducción en la excreción urinaria total y la excreción de sodio acumulada 80 minutos después de la administración de furosemida, mientras que estos parámetros se mantuvieron inalterados en las ratas que recibieron celecoxib.

Se demostró además, que este descenso en la respuesta a la furosemida, observado en las ratas que recibieron SC-560, fue dosis-dependiente, alcanzando relevancia estadística a dosis de 20 y 30 mg/kg.



4. Ni celecoxib ni SC-560 produjeron cambios en el metabolismo del agua en ratas con cirrosis y ascitis.

Para evaluar los efectos de los inhibidores sobre la capacidad renal de excretar agua libre, en estos animales se determinó la osmolalidad urinaria mínima (mUOsm) y el porcentaje excretado de agua respecto a la sobrecarga realizada (*% water load excreted*), durante un periodo de 3 horas tras la sobrecarga. Se observó que ninguno de los tratamientos (SC-560, celecoxib o placebo) produjo ningún cambio significativo ni en mUOsm ni en el porcentaje de agua excretado tras la sobrecarga.



# Cyclooxygenase-1 derived prostaglandins are involved in the maintenance of renal function in rats with cirrhosis and ascites

<sup>1</sup>Marta López-Parra, <sup>\*1</sup>Joan Clària, <sup>1</sup>Anna Planagumà, <sup>1</sup>Esther Titos, <sup>5</sup>Jaime L. Masferrer, <sup>5</sup>B. Mark Woerner, <sup>5</sup>Alane T. Koki, <sup>2</sup>Wladimiro Jiménez, <sup>4</sup>Rosario Altuna, <sup>3</sup>Vicente Arroyo, <sup>2</sup>Francisca Rivera & <sup>3</sup>Joan Rodés

<sup>1</sup>DNA Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona 08036, Spain; <sup>2</sup>Hormonal Laboratory, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona 08036, Spain; <sup>3</sup>Liver Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona 08036, Spain; <sup>4</sup>Pharmacia Spain, Barcelona 08190, Spain and <sup>5</sup>Pharmacia Research and Development, St Louis, Missouri, MO 63167, U.S.A.

**1** The maintenance of renal function in decompensated cirrhosis is highly dependent on prostaglandins (PGs). Since PG synthesis is mediated by cyclooxygenase-1 and -2 (COX-1 and COX-2), the present study was designed to examine which COX isoform is involved in this phenomenon.

**2** Renal COX-1 and COX-2 protein expression and distribution were analysed by Western blot and immunohistochemistry in nine rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis and ascites and 10 control animals. The effects of placebo and selective COX-1 (SC-560) and COX-2 (celecoxib) inhibitors on urine flow (V), urinary excretion of sodium ( $U_{Na}V$ ) and  $PGE_2$  ( $U_{PGE_2}V$ ), glomerular filtration rate (GFR), renal plasma flow (RPF), the diuretic and natriuretic responses to furosemide and renal water metabolism were assessed in 88 rats with cirrhosis and ascites.

**3** COX-1 protein levels were found to be unchanged in kidneys from cirrhotic rats. In contrast, these animals showed enhanced renal COX-2 protein expression which was focally increased in the corticomedullary region. Although  $U_{PGE_2}V$  was equally reduced by SC-560 and celecoxib, only SC-560 produced a significant decrease in  $U_{Na}V$ , GFR and RPF and a pronounced impairment in the diuretic and natriuretic responses to furosemide in rats with cirrhosis and ascites. Neither SC-560 nor celecoxib affected renal water metabolism in cirrhotic rats.

**4** These results indicate that despite abundant renal COX-2 protein expression, the maintenance of renal function in cirrhotic rats is mainly dependent on COX-1-derived prostaglandins.

*British Journal of Pharmacology* (2002) **135**, 891–900

**Keywords:** Experimental cirrhosis; renal COX expression; selective COX inhibition; renal function

**Abbreviations:** Celecoxib, 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]; GFR, glomerular filtration rate; NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs; PG, prostaglandin; RPF, renal plasma flow; SC-560, [5-(4-chlorophenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-trifluoromethylpyrazole]; V, urine flow;  $U_{PGE_2}V$ , urinary  $PGE_2$  excretion;  $U_{Na}V$ , urinary sodium excretion

## Introduction

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are among the most widely prescribed class of pharmaceutical agents world-wide, having broad clinical utility in treating pain, fever and inflammation (Payan & Katzung, 1995). Despite a relatively low incidence of renal side effects in healthy subjects, administration of NSAIDs to patients with unbalanced effective arterial blood volume, such as decompensated cirrhosis, represents a major clinical problem since renal function in these patients is critically dependent on prostaglandins (PGs) (Arroyo *et al.*, 1983; 1986; Dunn, 1984). In fact, acute PG inhibition with NSAIDs in patients with cirrhosis and ascites is associated with a significant impairment in renal hemodynamics, sodium excretion, free water clearance and renal response to furosemide and spironolactone (Boyer *et al.*, 1979; Zipser *et al.*, 1979;

Arroyo *et al.*, 1983; 1986; Planas *et al.*, 1983; Mirouze *et al.*, 1983; Pérez-Ayuso *et al.*, 1984; Dunn, 1984). Thus, in clinical practice, patients with decompensated cirrhosis cannot be treated with NSAIDs on a long term basis because of the high risk of developing renal failure and refractory ascites.

Cyclooxygenase (COX) is the key enzyme in the formation of PGs from arachidonate and is the major therapeutic target for NSAIDs (Vane, 1971). Two isoforms of COX, designated COX-1 and COX-2, have been identified (Kujubu *et al.*, 1991, Masferrer *et al.*, 1992; Hla & Neilson, 1992). COX-1 is ubiquitous and has been previously linked to the cytoprotective effects of PGs in the gut as well as to the integrity of platelet function. Conversely, COX-2 is undetectable in most tissues, but its expression can be induced by a variety of stimuli related to inflammatory response (Herschman, 1996). Conventional NSAIDs inhibit COX-1 and COX-2 and this feature

\*Author for correspondence; E-mail: jclaria@clinic.ub.es

accounts for both therapeutic and side effects (Warner *et al.*, 1999). Recently, selective COX-2 inhibitors have been developed to effectively inhibit COX-2-dependent inflammation while sparing physiologic PG production (Seibert *et al.*, 1994; Marnett & Kalgutkar, 1999). These novel compounds could potentially be the NSAIDs of choice in patients in whom, as occurs in cirrhosis with ascites, renal function is critically dependent on PGs.

To address the renal-damaging effects of NSAIDs in liver disease, we have previously used rats with carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced cirrhosis, an experimental model that closely reproduces the systemic and renal abnormalities seen in human cirrhosis (Clària & Jiménez, 1999). In fact, CCl<sub>4</sub>-induced cirrhotic rats also show increased renal PG synthesis and develop renal failure after receiving conventional NSAIDs such as aspirin (Ros *et al.*, 1995) and ketorolac (Bosch-Marcé *et al.*, 1999). Interestingly, we have recently shown that renal function in these animals remains unaffected by the administration of SC-236 (a research pre-clinical compound with high selectivity for COX-2 (Bosch-Marcé *et al.*, 1999)), suggesting that the renal side-effects of conventional NSAIDs in cirrhosis are secondary to COX-1 inhibition. Given that a selective COX-1 inhibitor was not available in that study, the current investigation was aimed to unequivocally establish which COX isoform is responsible for the synthesis of PGs involved in the maintenance of renal function in decompensated cirrhosis. To this end, we first analysed COX-1 and COX-2 protein expression and distribution by Western blot and immunohistochemistry, respectively, in kidneys from rats with CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis and ascites. In these animals, we next compared the effects of a selective COX-1 inhibitor (SC-560) with those of a selective COX-2 inhibitor (celecoxib) on renal hemodynamics and renal sodium handling. Subsequently, we assessed the effects of these COX inhibitors on the diuretic and natriuretic response to furosemide, and finally characterized which COX isoform is involved in the regulation of renal water metabolism in cirrhotic rats.

## Methods

### Materials

<sup>125</sup>I-Iothalamate, specific PGE<sub>2</sub> EIA and the ECL system were from Amersham Pharmacia (Buckinghamshire, U.K.). PAH was obtained from Merck & Co (West Point, PA, U.S.A.). Sep-Pack C<sub>18</sub> cartridges and HPLC columns were from Waters (Milford, MA, U.S.A.). Furosemide was from Hoechst Marion Roussel (Seguril<sup>®</sup>, Barcelona, Spain). MBF was from Streck Laboratories (Omaha, NE, U.S.A.). Immobilon-P PVDF membranes were from Millipore (Bedford, MA, U.S.A.). Tween 80, aprotinin, leupeptin, pepstatin A and phenylmethylsulphonyl fluoride were purchased from Sigma Chemical Co (St Louis, MO, U.S.A.). Ketorolac, COX-1 and COX-2 protein standards, COX-1 (murine) monoclonal antibody and COX-2 (murine) polyclonal antibody (Western blot) were from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, U.S.A.). Polyclonal rabbit anti-human COX-2 serum and anti-ovine COX-1 monoclonal antibody were from Oxford Biomedical Research (Oxford, MI, U.S.A.). Selective COX-1 (SC-560) and COX-2 (celecoxib)

inhibitors were provided by Pharmacia Research and Development (St Louis, MO, U.S.A.).

### Induction of cirrhosis in rats

The study was performed in 97 rats with cirrhosis and ascites. Cirrhosis was induced by CCl<sub>4</sub> inhalation in adult male Wistar rats (Charles-River, Saint Aubin les Elseuf, France) initially weighing 160–180 g, following a method described elsewhere (Clària & Jiménez, 1999). Cirrhotic rats were obtained from a group of 136 animals submitted to the cirrhosis induction protocol. Thirty-nine of these animals could not be included in the study for several reasons: 24 rats died before the development of ascites and/or impairment of renal water excretion, seven rats died before completing the experimental procedures and eight rats did not develop ascites and/or impairment to renal water excretion. Animals were maintained at the University of Barcelona animal facility and were fed *ad libitum* with standard chow and distilled water containing phenobarbital (0.3 g l<sup>-1</sup>) as drinking fluid. Cirrhotic rats were studied after the development of ascites, usually between 12 and 18 weeks of CCl<sub>4</sub> administration.

### Western blot analysis of COX-1 and COX-2 protein expression in renal tissue

Protein expression for COX-1 and COX-2 was assessed in renal tissue samples isolated from six cirrhotic rats with ascites and from seven control animals. Animals were anaesthetized with an i.m. injection of ketamine (50 mg kg<sup>-1</sup>) and the kidneys were rapidly dissected and stored in liquid nitrogen. Frozen tissues (150–180 mg) were homogenized in 30 mM Tris/HCl pH 7.4, 100 μM phenylmethylsulphonyl fluoride, containing protease inhibitors (1 μg ml<sup>-1</sup> each): leupeptin, pepstatin A and aprotinin. The homogenate was centrifuged at 1000 × g for 10 min and the supernatant was taken and subjected to a final centrifugation step at 100,000 × g for 70 min. Total protein concentration was determined by the Bradford Protein Assay. Aliquots from each sample containing equal amounts of protein (30–50 μg) were resuspended in SDS-containing Laemmli sample buffer and heated at 100°C for 5 min, electrophoresed on 10–12% SDS-polyacrylamide gels and transferred overnight to PVDF membranes. The efficiency of the transfer was visualized by Ponceau staining. The blots were subsequently blocked for 6 h with 50 mM Tris/HCl pH 7.4 and 100 mM NaCl (TBS) containing 5% nonfat dry milk and 0.5% Tween 20, followed by incubation (1 : 1000 dilution) for 16 h with antisera specific for either COX-1 or COX-2. After washing three times for 5 min each with 0.1% Tween 20 in TBS, the blots were incubated for 1 h at room temperature with 1 : 2000 dilution of sheep anti-mouse or donkey anti-rabbit secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase. Bands were visualized by an enhanced chemiluminescence (ECL) detection system.

### Immunohistochemical analysis of COX-1 and COX-2 protein distribution in renal tissue

Localization of COX-1 and COX-2 expression was assessed in renal tissue isolated from three cirrhotic rats with ascites

and three control rats. Animals were anaesthetized with an i.m. injection of ketamine (50 mg kg<sup>-1</sup>) and sacrificed. The kidneys were rapidly resected and cut to the appropriate size to facilitate efficient fixative penetration of the molecular biology fixative (MBF). MBF is an aqueous buffered solution containing organic and inorganic salts, supplemented with a bacteriostatic and fungistatic agent and provides excellent preservation of tissue structure and COX antigenicity. Tissues were fixed for 24 h at 4°C, transferred to 70% ethanol, embedded in paraffin, sectioned at 5 µm onto Fisher Gold SuperFrost Plus glass slides and finally, deparaffinized in xylene and re-hydrated in descending alcohols. Tissues were then blocked for endogenous peroxidase (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in MeOH) and avidin/biotin (Avidin Biotin Blocking Kit SP-2001, Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.). Sections were permeabilized in TNB-BB (0.1 M Tris pH 7.5, 0.015 M NaCl, 0.5% blocking agent, 0.3% Triton-X, 0.2% saponin), and incubated overnight at 4°C with polyclonal rabbit anti-human COX-2 serum diluted to 2.5 µg ml<sup>-1</sup> (Oxford Biomedical Research). COX-1 was immunolocalized with the anti-ovine monoclonal antibody (diluted to 1 µg ml<sup>-1</sup>) (Oxford Biomedical Research). Immunoreactive complexes were detected using tyramide signal amplification (TSA-indirect, NEN Life Science), and were visualized with the peroxidase substrates AEC or DAB. Control sections were treated with isotype-matched controls, or were pre-incubated with 100 fold excess of human recombinant COX-1 or COX-2 protein. To ensure rigid inter-slide consistency all slides were stained simultaneously on an autoimmunostainer. Pathological changes were described by a licensed pathologist following preparation of standard hematoxylin and eosin staining.

### Drug administration studies

**Study 1** The goal of this study was to investigate the effects of selective COX-1 (SC-560) and COX-2 (celecoxib) inhibitors on renal function in conscious rats with cirrhosis and ascites. For this purpose, 28 rats with cirrhosis and ascites were anaesthetized with an i.m. injection of ketamine (50 mg kg<sup>-1</sup>) and prepared with a PVC-50 catheter in the left femoral artery for hemodynamic measurements and blood collection, a double-lumen PVC-100 catheter in the right jugular vein for the infusion of substances, and a PVC-50 tube in the bladder for urine collection. The femoral artery catheter was connected to a highly sensitive transducer and a multichannel recorder (MX4P and MT4, Lectromed Ltd, Jersey, Channel Islands, U.K.) to register pulsatile mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR), while the jugular vein catheter was continuously perfused with Ringer solution (0.5 ml h<sup>-1</sup>). Catheters were connected to a swivel (Harvard Apparatus, South Natick, MA, U.S.A.) and animals were placed in rectangular cages with no restriction of movement. Twenty-four hours later, a priming dose of <sup>125</sup>I-Iothalamate (0.37 µCi) and para-aminohippurate (PAH) (3 mg) was given through the jugular vein, followed by a constant infusion (2 ml h<sup>-1</sup>) of a Ringer solution containing <sup>125</sup>I-Iothalamate (0.37 µCi ml<sup>-1</sup>) and PAH (3 mg ml<sup>-1</sup>). Animals were equilibrated for 1 h and after two baseline 20-min urine collection periods received 1 ml kg<sup>-1</sup> of 2% Tween 80 in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) containing the following: Group 1 (*n* = 8): Placebo; Group 2

(*n* = 10): Selective COX-1 inhibitor, SC-560 (20 mg kg<sup>-1</sup>, i.v.); Group 3 (*n* = 10): Selective COX-2 inhibitor, celecoxib (20 mg kg<sup>-1</sup>, i.v.).

The dose of SC-560 was selected from previous studies demonstrating inhibition of constitutive PG synthesis in euvoletic rats (Smith *et al.*, 1998; Wallace *et al.*, 2000; Gretzer *et al.*, 2001). The dose of celecoxib was selected from previous studies reporting complete inhibition of PG synthesis in the rat carrageenan footpad and airpouch models of inflammation (Smith *et al.*, 1998; Wallace *et al.*, 2000). Moreover, by using the zymosan-induced inflammation model in rats, Niederberger *et al.* (2001) have recently reported that celecoxib retains its anti-inflammatory efficacy at doses of up to 100 mg kg<sup>-1</sup>.

Subsequently, four 20-min urine collection periods were performed and changes in MAP, HR, urine volume (*V*), urinary sodium excretion (*U*<sub>Na</sub>*V*), glomerular filtration rate (GFR) and renal plasma flow (RPF) were recorded during the entire period. At the midpoint of each clearance period, a 0.5 ml blood sample was obtained. Urinary PGE<sub>2</sub> excretion (*U*<sub>PGE<sub>2</sub></sub>*V*) was measured under baseline conditions and during the fourth 20-min urine collection period following the administration of COX inhibitors.

Sodium and potassium concentrations in plasma and urine samples were measured by flame photometry (IL 943, Instrumentation Laboratory, Lexington, MA, U.S.A.) and serum osmolality by the osmometric depression of the freezing point in an Advanced Instruments Osmometer (model 3MO, Needham, MA, U.S.A.). GFR and RPF were estimated from <sup>125</sup>I-Iothalamate and PAH clearance respectively, using the standard formula:  $C_{Iothalamate} = \text{urinary } ^{125}\text{I counts} \times V / \text{plasma } ^{125}\text{I counts}$  and  $C_{PAH} = \text{urinary PAH concentration} \times V / \text{plasma PAH concentration}$ . The radioactivity of <sup>125</sup>I-Iothalamate samples was counted in an automatic scintillation counter (Wallac, Turku, Finland). PAH was determined by RP-HPLC as described (Decosterd *et al.*, 1997) with modifications. Briefly, 2 µl of plasma or urine in MeOH (final volume 25 µl) were injected into a RP-HPLC system which consisted of a Waters integrated system controller (model 600E) equipped with a 996 Photodiode Array Detector (DAD) and Millennium HPLC analysis software (Waters, Milford, MA, U.S.A.). For analysis of PAH, a HPLC column (either a Kromasil 100 C<sub>18</sub> (5 µm, 4.6 × 250 mm) or a Tracer Extrasil ODS2 (5 µm, 4.6 × 250 mm) was eluted with a linear gradient of MeOH:citrate-citric acid pH 3.9 (from 1:99 to 15:85, v v<sup>-1</sup> over 15 min) at a flow rate of 1.0 ml min<sup>-1</sup>. The spectrophotometric UV-VIS DAD was set at 273 nm. PGE<sub>2</sub> levels in urine were measured by specific EIA after extraction of samples on Sep-Pack C<sub>18</sub> cartridges.

**Study 2** The aim of this study was to investigate the effect of SC-560 and celecoxib on the renal diuretic and natriuretic responses to furosemide in rats with cirrhosis and ascites. Twenty-six rats with cirrhosis and ascites were prepared as described in *Study 1* and received placebo (*n* = 6), the selective COX-1 inhibitor SC-560 (20 mg kg<sup>-1</sup>, i.v.) (*n* = 10) or the selective COX-2 inhibitor celecoxib (20 mg kg<sup>-1</sup>, i.v.) (*n* = 10). Sixty minutes later, they received an i.v. injection of furosemide (5 mg kg<sup>-1</sup>) and changes in *V*, *U*<sub>Na</sub>*V*, GFR and RPF were recorded during four 20-min urine collection periods. In an additional group of 13 rats with cirrhosis and

ascites, the effects of increasing doses of SC-560 (10 and 30 mg kg<sup>-1</sup>, i.v.) and celecoxib (10 and 30 mg kg<sup>-1</sup>, i.v.) on the diuretic and natriuretic response to furosemide were also evaluated.

**Study 3** The aim of this study was to investigate the effect of SC-560 and celecoxib on renal water metabolism in rats with cirrhosis and ascites. Renal water metabolism was estimated in cirrhotic rats resting in metabolic cages, as follows: two hours after removing water and food, a water load (50 ml kg<sup>-1</sup>) was administered *via* a gastric tube inserted under light ether anaesthesia. Immediately afterwards, the animals were re-introduced into their metabolic cages where each spontaneous urine void was individually collected for a total period of 3 h. The renal ability of these animals to excrete free water was established by measuring the minimum urinary osmolality (mUOsm) from the osmometric depression of the freezing point of each spontaneously voided sample and by gravimetrically measuring the percentage (%) of the water load excreted during the 3-h urine collection period. After a 24-h period, animals received 1 ml kg<sup>-1</sup> of 2% Tween 80 in 0.5% carboxymethylcellulose containing the following treatments and doses selected from Smith *et al.* (1998), Wallace *et al.* (2000), Gretzer *et al.* (2001) and Niederberger *et al.* (2001). Group 1 (*n*=6): Placebo; Group 2 (*n*=7): SC-560 (30 mg kg<sup>-1</sup>, p.o.); Group 3 (*n*=8): celecoxib (30 mg kg<sup>-1</sup>, p.o.).

Twenty minutes after receiving the drug, the animals were submitted to a second oral water load of 50 ml kg<sup>-1</sup> and the percentage of water load excreted and the mUOsm were again determined during the 3-h period following the water administration (see above).

At the end of each study, tissue specimens were obtained from the middle liver lobe of each animal, fixed in 10% buffered formalin and stained with hematoxylin-eosin, reticulin and Masson's trichrome for histological examination.

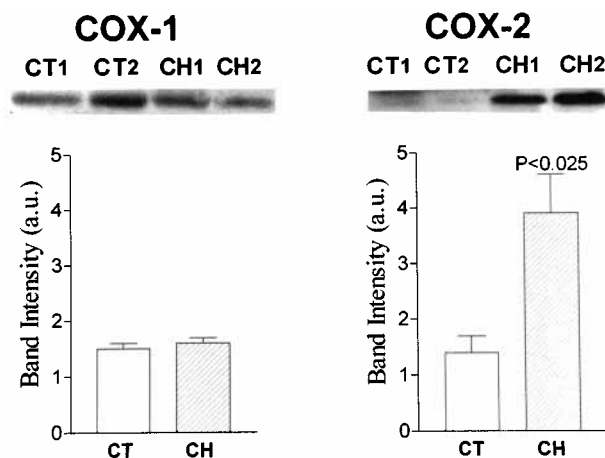
Statistical analysis of the results was performed by one-way ANOVA, Newman-Keuls and paired and unpaired Student's *t*-tests, as appropriate. Data are expressed as mean ± s.e.m. and were considered significant at a *P* level of 0.05 or less.

All animal studies were conducted in accordance with the criteria of the Investigation and Ethics Committee of the Hospital Clínic and the European Community laws governing the use of experimental animals.

## Results

Animals treated with CCl<sub>4</sub> showed the characteristic features of micronodular cirrhosis (i.e. a stage of well-established cirrhosis with a combination of nodular regeneration of liver cell plates surrounded by thick connective tissue septa and proliferating bile ducts). The volume of ascites of cirrhotic rats ranged between 12 and 40 ml.

Constitutive COX-1 and COX-2 protein expression was detected by Western blot and immunohistochemistry analysis in renal tissue collected from rats with cirrhosis and ascites (Figures 1–3). However, whereas COX-1 protein expression was found to be unchanged as compared to controls, COX-2 expression was consistently up-regulated in kidneys from cirrhotic rats (Figure 1). In these animals, COX-1 immunoreactivity was observed in the collecting ducts, renal



**Figure 1** Renal COX-1 and COX-2 protein levels. Upper panels: representative Western blot analysis of COX-1 ( $M_r$ , 70 kDa) and COX-2 ( $M_r$ , 72 kDa) in renal tissue samples from two control rats (CT1 and CT2) and two cirrhotic rats with ascites (CH1 and CH2). Renal protein extracts were electrophoresed and probed with specific anti-COX-1 and anti-COX-2 antibodies. Lower panels: COX-1 and COX-2 band intensities were determined by scanning densitometry. Results show the mean ± s.e.m. of six cirrhotic and seven control rats.

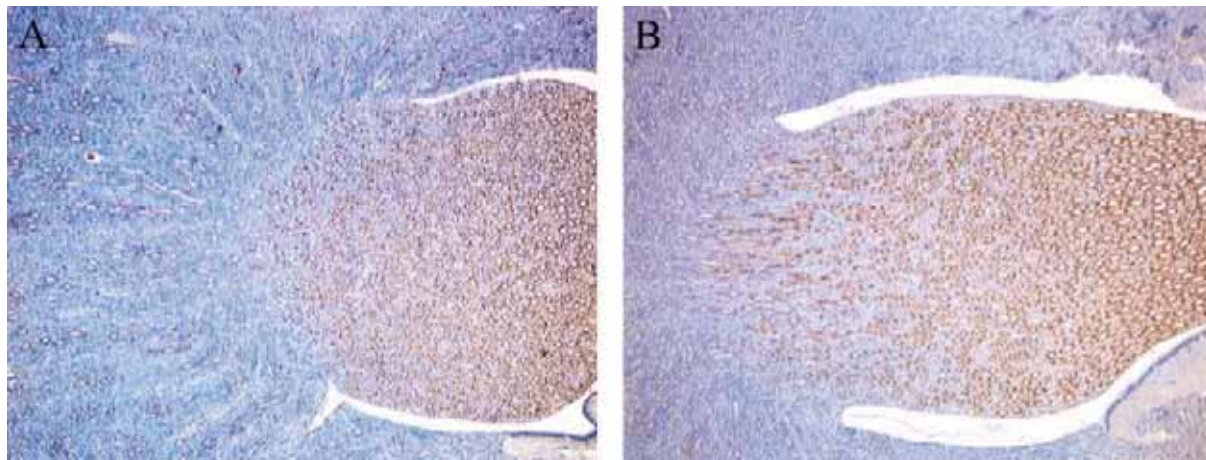
vasculature, and papillary interstitial cells, being its expression intense in the papillary collecting ducts and low-to-moderate in the cortical collecting ducts (Figure 2). On the other hand, positive COX-2 immunoreactive protein was localized in the macula densa and outer medulla collecting ducts (Figure 3).

### *Study 1: Effect of selective COX inhibitors on renal hemodynamics and renal excretory function in rats with cirrhosis and ascites*

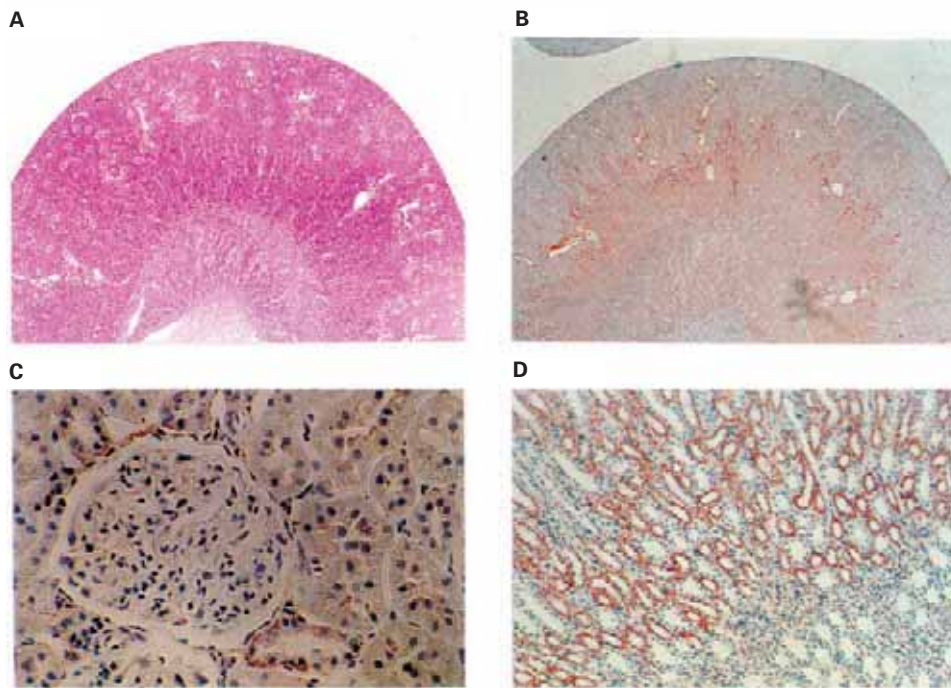
No statistically significant differences were detected in the three groups of rats receiving placebo, SC-560 or celecoxib with respect to baseline body weight, MAP, HR, serum sodium and potassium concentrations, serum osmolality,  $V$ ,  $U_{Na}V$ ,  $U_{PGE_2}V$ , GFR and RPF (Table 1).

Figure 4 shows the effects of placebo, SC-560 or celecoxib on  $V$ ,  $U_{Na}V$ , GFR and RPF in cirrhotic rats with ascites. The i.v. administration of the selective COX-1 inhibitor SC-560 significantly decreased  $V$ ,  $U_{Na}V$ , GFR and RPF in cirrhotic rats. In these animals, renal function was impaired as early as 20 min following SC-560 administration and experienced a progressive decline throughout the entire study period, except for  $U_{Na}V$  which reached a maximum plateau at 40 min after the administration of the drug (Figure 4). In contrast, the renal effects associated with selective COX-2 inhibition with celecoxib were similar to those of placebo except that celecoxib induced a reduction in  $V$  which reached statistical significance at 60 min after administration of the drug (Figure 4). This effect, however, was transient and rapidly reversed and after 80 min of receiving celecoxib, the  $V$  values in this group of animals did not differ from those of the placebo group. No changes in MAP and HR were observed throughout the entire course of the study in any group of cirrhotic animals (data not shown).

The administration of SC-560 and celecoxib to cirrhotic rats was associated with a 48% (from  $312 \pm 82$  to



**Figure 2** Localization of COX-1 protein expression in control rats (A) and rats with cirrhosis and ascites (B). COX-1 is observed in the collecting ducts, renal vasculature, and papillary interstitial cells. Intense COX-1 immunoreactivity is detected in the papillary collecting ducts, and low-to-moderate expression detected in the cortical collecting ducts.



**Figure 3** Localization of immunoreactive COX-2 protein expression in kidneys from rats with cirrhosis and ascites. Low-magnification micrograph showing a longitudinal section of the kidney stained with hematoxylin-eosin (A) or reacted with a polyclonal rabbit antimurine COX-2 (B). In the cortex, COX-2 staining was observed in the macula densa (C), whereas in the medulla, strong immunoreactivity for COX-2 was localized in tubular epithelial cells (D).

$163 \pm 54 \text{ pg min}^{-1}$ ,  $P < 0.05$ ) and 47% (from  $389 \pm 93$  to  $203 \pm 111 \text{ pg min}^{-1}$ ), inhibition in  $U_{\text{PGE}_2\text{V}}$ , respectively.

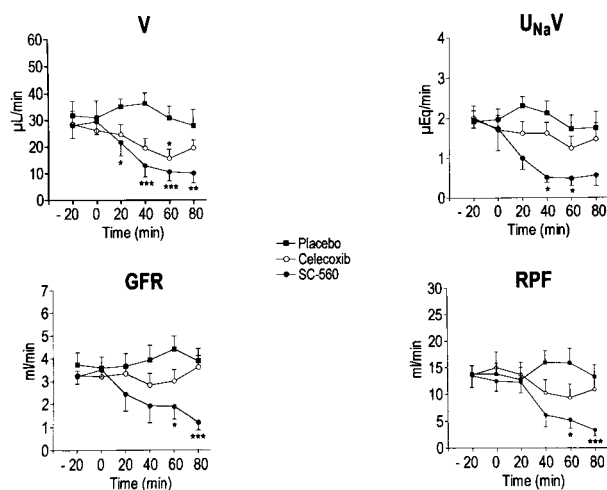
*Study 2: Effect of selective COX inhibitors on the renal response to furosemide in rats with cirrhosis and ascites*

Figure 5 shows the results obtained in the three groups of animals included in this study. As expected, in cirrhotic rats receiving placebo, the i.v. injection of  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  of furosemide was followed by a pronounced increase in  $V$  (diuretic effect) and  $U_{\text{Na}}V$  (natriuretic effect) (Figure 5). This

effect was rapid (reached a maximum after 20 min) and transient (disappeared in most cases 60–80 min after the administration of furosemide). Parallel changes in GFR and RPF were also observed in this group of animals following the administration of furosemide, although the duration of these changes was shorter than that elicited on  $V$  and  $U_{\text{Na}}V$  (data not shown). The injection of furosemide to cirrhotic rats treated with the selective COX-1 inhibitor SC-560 was associated with reduced diuretic and natriuretic response to this drug (Figure 5). In sharp contrast, the diuretic and natriuretic efficacy of furosemide in cirrhotic rats was not

**Table 1** Baseline values for the three groups of cirrhotic rats receiving placebo, SC-560 or celecoxib included in *Study 1*.

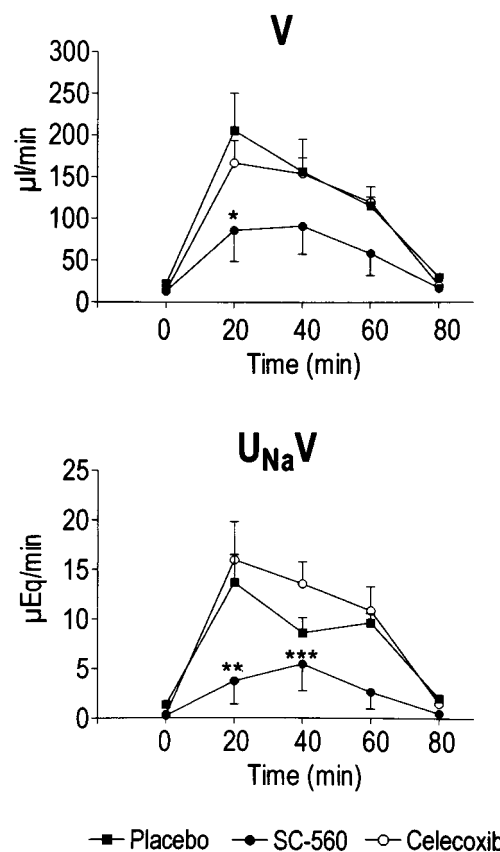
	Placebo (n=8)	SC-560 (n=10)	Celecoxib (n=10)
Body weight (g)	595 ± 28	569 ± 21	569 ± 30
MAP (mmHg)	90 ± 7	91 ± 6	91 ± 6
HR (beats min <sup>-1</sup> )	439 ± 2	436 ± 17	401 ± 13
Serum sodium (mEq l <sup>-1</sup> )	138 ± 1	130 ± 7	133 ± 3
Serum potassium (mEq l <sup>-1</sup> )	3.9 ± 0.2	3.7 ± 0.2	3.8 ± 0.2
Serum osmolality (mOsm kg <sup>-1</sup> )	294 ± 2	292 ± 3	290 ± 2
V (μl min <sup>-1</sup> )	31 ± 5	28 ± 4	28 ± 4
U <sub>Na</sub> V (μEq min <sup>-1</sup> )	1.9 ± 0.2	1.8 ± 0.3	1.8 ± 0.3
U <sub>PGE<sub>2</sub></sub> V (pg min <sup>-1</sup> )	212 ± 92	312 ± 82	389 ± 93
GFR (ml min <sup>-1</sup> )	3.6 ± 0.5	3.3 ± 0.3	3.2 ± 0.2
RPF (ml min <sup>-1</sup> )	13.7 ± 1.6	12.9 ± 2.1	14.2 ± 1.7

**Figure 4** Effect of selective COX inhibitors on renal function in rats with cirrhosis and ascites. Urine flow (V), urinary sodium excretion (U<sub>Na</sub>V), glomerular filtration rate (GFR) and renal plasma flow (RPF) were measured before (-20 and 0 min) and up to 80 min after the i.v. administration of placebo (n=8), the selective COX-1 inhibitor (SC-560, 20 mg kg<sup>-1</sup>, n=10) or the selective COX-2 inhibitor (celecoxib, 20 mg kg<sup>-1</sup>, n=10) to rats with cirrhosis and ascites. Results are given as mean ± s.e.m. Data are compared with the Student's *t*-test for paired data. \**P*<0.05; \*\**P*<0.025 and \*\*\**P*<0.001 vs values at 0 min.

affected by celecoxib (Figure 5). Consequently, rats treated with SC-560 showed a pronounced reduction in overall urine output and cumulative sodium excretion over the 80 min period after furosemide injection, whereas these parameters remained unaltered in those rats treated with celecoxib (Figure 6). The decrease in the response to furosemide in rats receiving SC-560 was dose-dependent and reached statistical significance at doses of 20 and 30 mg kg<sup>-1</sup> (Figure 6).

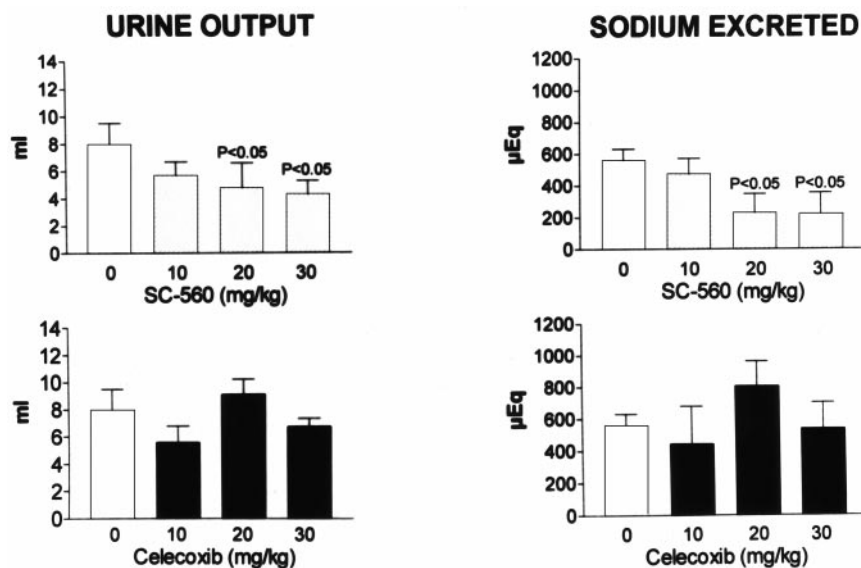
### Study 3: Effects of COX inhibitors on renal water metabolism in rats with cirrhosis and ascites.

Under baseline conditions, all three treatment groups exhibited similar renal ability to excrete free water, as estimated by the percentage of water load excreted (placebo: 82 ± 11%; SC-560: 92 ± 6% and celecoxib: 86 ± 7%) and mUOsm (Placebo: 103 ± 15 mOsm kg<sup>-1</sup>; SC-560: 69 ± 5 mOsm kg<sup>-1</sup> and celecoxib: 88 ± 17 mOsm kg<sup>-1</sup>). Figure 7 shows the percentage

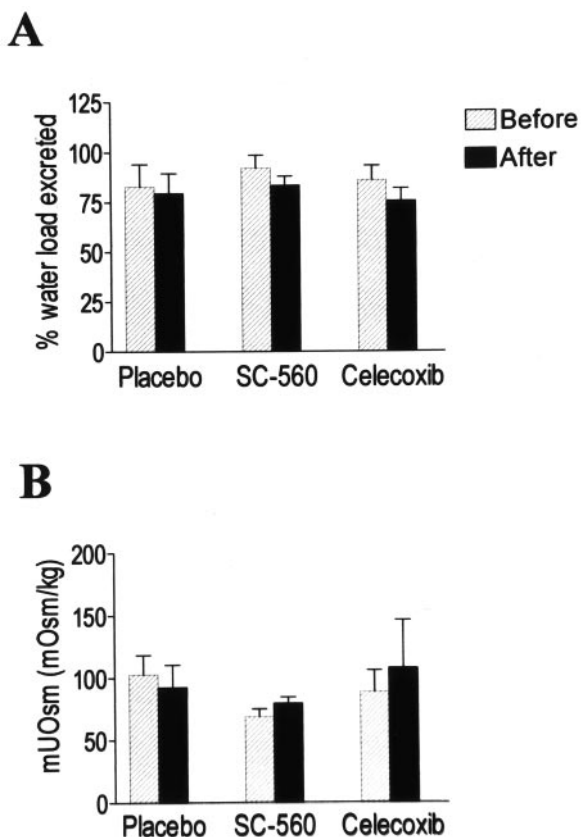
**Figure 5** Effect of selective COX inhibitors on the renal response to furosemide in rats with cirrhosis and ascites. Animals received i.v. placebo (n=6), the selective COX-1 inhibitor (SC-560, 20 mg kg<sup>-1</sup>, n=10) or the selective COX-2 inhibitor (celecoxib, 20 mg kg<sup>-1</sup>, n=10) and 1 h later they were challenged with an i.v. injection of furosemide (5 mg kg<sup>-1</sup>) (time 0 min). Changes in urine flow (V) and urinary sodium excretion (U<sub>Na</sub>V) were recorded for four 20-min urine collection periods after the injection of furosemide. Results are given as mean ± s.e.m. Data are compared with the Student's *t*-test for unpaired data. \**P*<0.05; \*\**P*<0.025 and \*\*\**P*<0.005 vs placebo-treated group.

of water load excreted and mUOsm under baseline conditions and following the oral administration of the drugs to rats with cirrhosis and ascites. In these animals, neither placebo, SC-560 or celecoxib produced any significant change in either the percentage of water load excreted or mUOsm (Figure 7).





**Figure 6** Diuretic and natriuretic responses to furosemide in rats with cirrhosis and ascites treated with increasing doses of selective COX inhibitors. Graph bars show the overall urine output and the cumulative sodium excretion over the 80 min after the administration of furosemide ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) to different groups of rats treated with placebo ( $0 \text{ mg kg}^{-1}$ ), SC-560 ( $10, 20$  or  $30 \text{ mg kg}^{-1}$ ) or celecoxib ( $10, 20$  or  $30 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Results are given as mean  $\pm$  s.e.m. Data are compared by the Student's *t*-test for unpaired data and *P* values denote statistically significant differences with respect to the placebo-treated group.



**Figure 7** Effects of selective COX inhibitors on renal water metabolism in rats with cirrhosis and ascites. The percentage (%) water load excreted (A) and the mUOsm (B) were measured before and after the administration of placebo ( $n=6$ ), SC-560 ( $30 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $n=7$ ) or celecoxib ( $30 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $n=8$ ) to cirrhotic rats with ascites. Results represent the mean  $\pm$  s.e.m. and data are compared by the Student's *t*-test for paired data.

## Discussion

Renal PG synthesis is markedly increased in patients with cirrhosis and ascites as compared to patients with compensated cirrhosis (no ascites) and normal subjects (Arroyo *et al.*, 1986; Dunn, 1984; Arroyo *et al.*, 1983; Planas *et al.*, 1983). In compensated cirrhosis, this increase is a homeostatic response to antagonize the exacerbated activity of the endogenous vasoconstrictor systems (i.e. the renin-angiotensin system, the sympathetic nervous system and the antidiuretic hormone (ADH)). Two lines of evidence support this contention. Firstly, acute PG inhibition with NSAIDs (indomethacin, ibuprofen, naproxen, sulindac or aspirin) in patients with cirrhosis and ascites is associated with a significant decrease in  $V$ ,  $U_{\text{Na}}V$ , GFR and RPF (Dunn, 1984; Arroyo *et al.*, 1983; Boyer *et al.*, 1979; Mirouze *et al.*, 1983; Zipser *et al.*, 1979). Patients with high plasma renin activity and plasma norepinephrine concentrations are particularly sensitive to these adverse effects. NSAIDs do not impair renal function in patients with compensated cirrhosis who do not show increased activity of the renin-angiotensin and sympathetic nervous systems. Secondly, acute PG inhibition with aspirin in patients with cirrhosis, ascites and increased plasma ADH levels is associated with a significant reduction in the renal ability to excrete free water (Pérez-Ayuso *et al.*, 1984). In addition, PGs are also important in the renal response to diuretics since the administration of aspirin, naproxen, indomethacin and sulindac suppresses the renal hemodynamic effect and reduces the natriuretic efficacy of furosemide in cirrhotic patients with ascites (Planas *et al.*, 1983).

Although the role of PGs in the maintenance of renal function in cirrhosis is well established, at present it is unknown which COX isoform (COX-1 or COX-2) is responsible for the synthesis of PGs involved in renal homeostasis in this disease. Under normal conditions, both

COX-1 and COX-2 are constitutively expressed in the kidneys (O'Neill & Ford-Hutchinson, 1993; Harris *et al.*, 1994; Vio *et al.*, 1997; Jensen & Kurtz, 1997; Khan *et al.*, 1998; Bosch-Marcé *et al.*, 1999). Specifically, in normal rats, COX-1 is mainly expressed in cells of the collecting duct and renal vasculature and in a small number of papillary interstitial cells, while COX-2 expression is consistently focal and limited to the macula densa of the juxtaglomerular apparatus, epithelial cells of the thick ascending limb and papillary interstitial cells (Khan *et al.*, 1998; Vio *et al.*, 1997; Harris *et al.*, 1994; Jensen & Kurtz, 1997). Our results show that both COX-1 and COX-2 are also present in kidneys from rats with cirrhosis and ascites. Moreover, whereas the expression of COX-1 was found to be unchanged, the expression of COX-2 was up-regulated in kidneys of cirrhotic rats. These findings are consistent with the notion that COX-2, but not COX-1, is regulated in a cell-specific fashion in response to altered volume status. Indeed, increased COX-2 expression has been reported in the macula densa and perimacula densa region of rats and dogs with chronic salt depletion and in the renal medulla of rats with a high-salt diet (Khan *et al.*, 1998; Harris *et al.*, 1994; Jensen & Kurtz, 1997; Yang *et al.*, 1998). Furthermore, increased COX-2 expression has been reported in the renal medulla of water-deprived rats (Yang *et al.*, 1999). Collectively, these results suggest that renal COX-2 up-regulation in cirrhosis is likely to be a consequence of changes in volume status, although the exact mechanism for this phenomenon is, at present, not understood.

Despite cirrhotic rats showing increased COX-2 protein immunoreactivity in the renal area, renal function in these animals appears to be mainly dependent on PGs derived from COX-1. In fact, in *Study 1* of this investigation, we observed a significant inhibition in renal PGE<sub>2</sub> synthesis concomitant with marked impairment in renal haemodynamics and renal sodium handling following the administration of a selective COX-1 inhibitor (SC-560) to CCl<sub>4</sub>-induced cirrhotic rats. In contrast, the selective COX-2 inhibitor celecoxib did not compromise renal function in cirrhotic rats. Interestingly, and although celecoxib administration was not associated with severe renal effects in cirrhotic rats, this compound reduced U<sub>PGE<sub>2</sub></sub>V to levels equivalent to SC-560. McAdam *et al.* (1999) also found a similar suppression in urinary PG excretion in both healthy subjects treated with celecoxib and in those receiving ibuprofen. Taken together, these results suggest that urinary PGs are derived from both COX-1 and COX-2, yet only those from COX-1 are involved in the maintenance of renal function in cirrhosis. The physiological significance of PGs derived from COX-2 in the kidneys, not only in disease states, but also in healthy conditions, remains to be determined.

PGs are clearly involved in the renal natriuretic response to loop diuretics (Katayama *et al.*, 1984). Loop diuretics, such as furosemide, are the most powerful diuretics currently available. These drugs inhibit sodium reabsorption in the ascending limb of the loop of Henle by acting on a specific co-transport system, the Na<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>-K<sup>+</sup> carrier (Puschett, 1981). Loop diuretics also increase GFR and renal blood flow and the renal production of PGE<sub>2</sub> whereas NSAIDs can modulate the renal vasodilatory effect and the natriuretic efficiency of these drugs (Katayama *et al.*, 1984). The results obtained in *Study 2* demonstrate that response to furosemide in cirrhotic rats is mainly dependent on COX-1 derived PGs

and that selective COX-2 inhibition spares furosemide-induced renal salt transport in cirrhosis. It is noteworthy to point out that in cirrhotic rats the effects of selective COX-1 inhibition with SC-560 on furosemide-induced diuretic and natriuretic response were dose-dependent. However, contrary to what was previously reported by Katayama *et al.* (1984), who found that indomethacin can either enhance or inhibit the effect of furosemide-induced natriuresis depending on the dose of this conventional NSAID used, we found that at low doses (10 mg kg<sup>-1</sup>), SC-560 induced no changes whereas higher doses (20 and 30 mg kg<sup>-1</sup>) significantly inhibited the response to furosemide.

PGs are also involved in renal water transport by modulating the tubular actions of ADH (Mattix & Badr, 2000). Specifically, PGE<sub>2</sub> inhibits the hydroosmotic effect of ADH whereas PG inhibition with NSAIDs enhances the tubular effect of this hormone (Mattix & Badr, 2000; Hébert *et al.*, 1990). In our study, neither SC-560 nor celecoxib modified renal water metabolism in rats with cirrhosis and ascites. These results are in sharp contrast with those previously obtained with the NSAID ketorolac which significantly impaired the ability to excrete free water in cirrhotic rats (Bosch-Marcé *et al.*, 1999). Given that ketorolac is a mixed COX-1/COX-2 inhibitor, these findings suggest that renal water homeostasis in cirrhosis is dependent on PGs derived from both COX isoforms. Thus, a compensatory mechanism appears to be present in cirrhotic rat kidneys, in such a way that when only one isoform is inhibited, water metabolism can be maintained by PGs produced by the other isoform.

Controlled clinical studies have demonstrated that selective COX-2 inhibitors have equal therapeutic efficacy but with a lower incidence of gastrointestinal ulcers and erosions than conventional NSAIDs (Emery *et al.*, 1999; Bombardier *et al.*, 2000). The marketed selective COX-2 inhibitors rofecoxib and celecoxib have also been evaluated in randomized controlled trials in terms of their effects on renal PGs, renal function and occurrence of adverse renal events. Whereas in elderly subjects, rofecoxib did not produce any significant alteration in GFR after 2 weeks of treatment, it produced a reduction in urinary sodium excretion similar to that with indomethacin during the first 3 days of therapy (Catella-Lawson *et al.*, 1999). In contrast, in elderly patients with mild renal impairment and stabilized on a low-sodium diet, rofecoxib produced decreases in GFR of similar magnitude to those observed in indomethacin-treated subjects, without affecting urinary sodium excretion (Swan *et al.*, 2000). In elderly patients, celecoxib, like rofecoxib, failed to decrease GFR, but did produce transient reductions in urinary sodium excretion similar to those of naproxen (Whelton *et al.*, 2000). Finally, in a trial in salt-depleted subjects, celecoxib not only promoted sodium retention but also produced significant dose-related decreases in GFR (Rossat *et al.*, 1999). Therefore, the unwanted renal-side effects of selective COX-2 inhibitors still remain, at present, uncharacterized. This subject is particularly important in circumstances more susceptible to NSAID-induced renal failure, such as advanced liver disease, congestive heart failure and nephrotic syndrome. For this reason, our findings in the experimental model of cirrhosis warrant further studies in humans investigating the feasibility of selective COX-2 inhibitors possibly being the anti-inflammatory option of choice in patients with chronic liver disease.

These studies were supported in part by Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF 00/0043) and Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 00/0616). M. López-Parra and E. Titos were supported by Ministerio de Ciencia y Tecnología and Ministerio de Sanidad y

Consumo (BEFI 98/9314), respectively. A. Planagumà received a fellowship from IDIBAPS. The authors are indebted to M. Borrajo for expert technical assistance.

## References

- ARROYO, V., PLANAS, R., GAYA, J., DEULOFEU, R., RIMOLA, A., PÉREZ-AYUSO, R.M., RIVERA, F. & RODÉS, J. (1983). Sympathetic nervous activity, renin-angiotensin system and renal excretion of prostaglandin E<sub>2</sub> in cirrhosis. Relationship to functional renal failure and sodium and water excretion. *Eur. J. Clin. Invest.*, **13**, 271–278.
- ARROYO, V., GINÉS, P., RIMOLA, A. & GAYA, J. (1986). Renal function abnormalities, prostaglandins, and effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cirrhosis with ascites. An overview with emphasis on pathogenesis. *Am. J. Med.*, **81**, 104–122.
- BOMBARDIER, C., LAINE, L., REICIN, A., SHAPIRO, D., BURGOS-VARGAS, R., DAVIS, B., DAY, R., FERRAZ, M.B., HAWKEY, C.J., HOCHBERG, M.C., KVIEN, T.K. & SCHNITZER, T.J. (2000). Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.*, **343**, 1520–1528.
- BOSCH-MARCÉ, M., CLÀRIA, J., TITOS, E., MASFERRER, J.L., ALTUNA, R., POO, J.L., JIMÉNEZ, W., ARROYO, V., RIVERA, F. & RODÉS, J. (1999). Selective inhibition of cyclooxygenase-2 spares renal function and prostaglandin synthesis in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology*, **116**, 1167–1175.
- BOYER, T.D., ZIA, P. & REYNOLDS, T.B. (1979). Effect of indomethacin and prostaglandin A<sub>1</sub> on renal function and plasma renin activity in alcoholic liver disease. *Gastroenterology*, **77**, 215–222.
- CATELLA-LAWSON, F., MCADAM, B., MORRISON, B.W., KAPOOR, S., KUJUBU, D., ANTES, L., LASSETER, K.C., QUAN, H., GERTZ, B.J. & FITZGERALD, G.A. (1999). Effects of specific inhibition on cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics and vasoactive eicosanoids. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **289**, 735–741.
- CLÀRIA, J. & JIMÉNEZ, W. (1999). Renal dysfunction and ascites in carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats. In *The Liver and the Kidney*. ed. Arroyo, V., Schrier, R.W., Rodés, J., Ginés, P. pp. 379–396, Boston: Blackwell Science.
- DECOSTERD, L.A., KARAGIANNIS, A., ROULET, J.M., BÉLAZ, N., APPENZELER, M., BUCLIN, T., VOGEL, P. & BIOLLAZ, J. (1997). High-performance liquid chromatography of the renal blood flow marker *p*-aminohippuric acid (PAH) and its metabolite *N*-acetyl PAH improves PAH clearance measurements. *J. Chromatol.*, **703**, 25–36.
- DUNN, M.J. (1984). Role of eicosanoids in the control of renal function in severe hepatic disease. *Gastroenterology*, **87**, 1392–1395.
- EMERY, P., ZEIDLER, H., KVIEN, T.K., GUSLANDI, M., NAUDIN, R., STEAD, H., VERBURG, K.M., ISAKSON, P.C., HUBBARD, R.C. & GEIS, G.S. (1999). Celecoxib versus diclofenac in long-term management of rheumatoid arthritis: randomised double-blind comparison. *Lancet*, **354**, 2106–2111.
- GRETZER, B., MARICIC, N., RESPONDEK, M., SCHULIGOI, R. & PESKAR, B.M. (2001). Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 in the rat stomach with normal mucosa and after acid challenge. *Br. J. Pharmacol.*, **132**, 1565–1573.
- HARRIS, R.C., MCKANNA, J.A., AKAI, Y., JACOBSON, H.R., DUBOIS, R.N. & BREYER, M.D. (1994). Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J. Clin. Invest.*, **94**, 2504–2510.
- HÉBERT, R.L., JACOBSON, H.R. & BREYER, M.D. (1990). PGE<sub>2</sub> inhibits AVP-induced water flow in cortical collecting ducts by protein kinase C activation. *Am. J. Physiol.*, **259**, F318–F325.
- HERSCHMAN, H.R. (1996). Prostaglandin synthase 2. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1299**, 125–140.
- HLA, T. & NEILSON, K. (1992). Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 7384–7388.
- JENSEN, B.L. & KURTZ, A. (1997). Differential regulation of renal cyclooxygenase mRNA by dietary salt intake. *Kidney Int.*, **52**, 1242–1249.
- KATAYAMA, S., ATTALLAH, A.A., STAHL, R.A., BLOCH, D.L. & LEE, J.B. (1984). Mechanism of furosemide-induced natriuresis by direct stimulation of renal prostaglandin E<sub>2</sub>. *Am. J. Physiol.*, **247**, F555–F561.
- KHAN, K., VENTURINI, C.M., BUNH, R.T., BRASSARD, J.A., KOKI, A.T., MORRIS, D.L., TRUMP, B.F., MAZIASZ, T.J. & ALDEN, C.L. (1998). Interspecies differences in renal localization of cyclooxygenase isoforms: implications in nonsteroidal antiinflammatory drug-related nephrotoxicity. *Toxic. Pathol.*, **26**, 612–620.
- KUJUBU, D.A., FLETCHER, B.S., VARNUM, B.C., LIM, R.W. & HERSCHMAN, H.R. (1991). TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J. Biol. Chem.*, **266**, 12866–12872.
- MARNETT, L.J. & KALGUTKAR, A.S. (1999). Cyclooxygenase 2 inhibitors: discovery, selectivity and the future. *TIPS*, **20**, 465–469.
- MASFERRER, J.L., SEIBERT, K., ZWEIFEL, B.S. & NEEDLEMAN, P. (1992). Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 3917–3921.
- MATTIX, H.J. & BADR, K.F. (2000). Arachidonic acid metabolites and the kidney. In *The Kidney*. ed. Brenner, B.M., Rector, F.C. pp. 756–792, Philadelphia: Saunders.
- MCADAM, B.F., CATELLA-LAWSON, F., MARDINI, I.A., KAPOOR, S., LAWSON, J.A. & FITZGERALD, G.A. (1999). Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 272–277.
- MIROUZE, D., ZIPSER, R.D. & REYNOLDS, T.D. (1983). Effects of inhibitors of prostaglandin synthesis on induced diuresis in cirrhosis. *Hepatology*, **3**, 50–55.
- NIEDERBERGER, E., TEGEDER, I., VETTER, G., SCHMIDTKO, A., SCHMIDT, H., EUCHENHOFER, C., BRÄUTIGAM, L., GRÖSCH, S. & GEISSLINGER, G. (2001). Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF-κB. *FASEB J.*, **15**, 1622–1624.
- O'NEILL, G.P. & FORD-HUTCHINSON, A.W. (1993). Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett.*, **330**, 156–160.
- PAYAN, D.G. & KATZUNG, B.G. (1995). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs; nonopioid analgesics; drugs used in gout. In *Basic & Clinical Pharmacology*. ed. Katzung, B.G. pp. 536–559 Norwalk: Appleton & Lange.
- PÉREZ-AYUSO, R.M., ARROYO, V., CAMPS, J., RIMOLA, A., GAYA, J., COSTA, J., RIVERA, F. & RODÉS, J. (1984). Evidence that renal prostaglandins are involved in renal water metabolism in cirrhosis. *Kidney Int.*, **26**, 72–80.
- PLANAS, R., ARROYO, V., RIMOLA, A., PÉREZ-AYUSO, R.M. & RODÉS, J. (1983). Acetylsalicylic acid suppresses the renal hemodynamic effect and reduces the diuretic action of furosemide in cirrhosis with ascites. *Gastroenterology*, **84**, 247–252.
- PUSCHETT, J.B. (1981). Sites and mechanisms of diuretics in the kidney. *J. Clin. Pharmacol.*, **21**, 564–574.
- ROS, J., CLÀRIA, J., JIMÉNEZ, W., BOSCH-MARCÉ, M., ANGELI, P., ARROYO, V., RIVERA, F. & RODÉS, J. (1995). Role of nitric oxide and prostacyclin in the control of renal perfusion in experimental cirrhosis. *Hepatology*, **22**, 915–920.
- ROSSAT, J., MAILLARD, M., NUSSBERGER, J., BRUNNER, H.R. & BURNIER, M. (1999). Renal effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition in normotensive salt-depleted subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **66**, 76–84.

- SWAN, S., RUDY, D.W., LASSETER, K.C., RYAN, C.F., BUECHEL, K.L., LAMBRECHT, L.J., PINTO, M.B., DILZER, S.C., OBRDA, O., SUNDBLAD, K.J., GUMBS, C.P., EBEL, D.L., QUAN, H., LARSON, P.J., SCHWARTZ, J.I., MUSLINER, T.A., GERTZ, B.J., BRATER, C. & YAO, S.-L. (2000). Effect of cyclooxygenase-2 inhibition on renal function in elderly persons receiving a low-salt diet. *Ann. Intern. Med.*, **133**, 1–9.
- SEIBERT, K., ZHANG, Y., LEAHY, K., HAUSER, S., MASFERRER, J., PERKINS, W., LEE, L. & ISAKSON, P. (1994). Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 12013–12017.
- SMITH, C.J., ZHANG, Y., KOBOLDT, C.M., MUHAMMAD, J., ZWEIFEL, B.S., SHAFFER, A., TALLEY, J.J., MASFERRER, J.L., SEIBERT, K. & ISAKSON, P.C. (1998). Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 13313–13318.
- VANE, J.R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for the aspirin-like drugs. *Nature*, **231**, 232–235.
- VIO, C.P., CESPEDES, C., GALLARDO, P. & MASFERRER, J.L. (1997). Renal identification of cyclooxygenase-2 in a subset of thick ascending limb cells. *Hypertension*, **30**, 687–692.
- WALLACE, J.L., McKNIGHT, W., REUTER, B.K. & VERGNOLLE, N. (2000). NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology*, **119**, 706–714.
- WARNER, T.D., GIULIANO, F., VOJNOVIC, I., BUKASA, A., MITCHELL, J.A. & VANE, J.R. (1999). Nonsteroid drug selectivities for cyclooxygenase-1 rather than cyclooxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 7563–7568.
- WHELTON, A., SCHULMAN, G., WALLEMARK, C., DROWER, E.J., ISAKSON, P.C., VERBURG, K.M. & GEIS, G.S. (2000). Effects of celecoxib and naproxen on renal function in the elderly. *Arch. Intern. Med.*, **160**, 1465–1470.
- YANG, T., SCHNERMANN, J.B. & BRIGGS, J.P. (1999). Regulation of cyclooxygenase-2 expression in renal medulla by tonicity in vivo and in vitro. *Am. J. Physiol.*, **277**, F1–F9.
- YANG, T., SINGH, I., PHAM, H., SUN, D., SMART, A., SCHNERMANN, J.B. & BRIGGS, J.P. (1998). Regulation of cyclooxygenase expression by dietary salt intake. *Am. J. Physiol.*, **274**, F481–F489.
- ZIPSER, R., HOEFS, J.C., SPECKART, P.F., ZIA, P.K. & HORTON, R. (1979). Prostaglandins: modulators of renal function and pressor resistance in chronic liver disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **48**, 895–900.

(Received November 1, 2001  
Accepted November 23, 2001)

## **Artículo 2: El inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 celecoxib modula la formación de eicosanoides vasoconstrictores y activa el PPAR $\gamma$ . Influencia de la albúmina.**

Aunque el mecanismo de acción de los inhibidores selectivos de la COX-2 esté basado en su capacidad de inhibir la formación de PGs derivadas de esta isoforma, no pueden excluirse otras acciones adicionales que están siendo demostradas en los últimos años. En este segundo trabajo, se quisieron investigar los mecanismos moleculares de celecoxib en una línea de células mesangiales de rata (RMC 85/4), y la influencia de la albúmina. Tras incubar las células con celecoxib en presencia o ausencia de albúmina, se determinó la producción de determinados eicosanoides vasoconstrictores, la liberación de renina y la expresión de actina  $\alpha$  de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) por estas células. Además, también se evaluó el efecto de celecoxib sobre el PPAR $\gamma$  mediante ensayos de transactivación en esta línea celular. Los resultados se enumeran a continuación:

1. En estado basal, las células RMC 85/4 expresan COX-1, COX-2 y 12/15-LO, y producen PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>, 12-HETE, 8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , cisteinil-LTs y LTB<sub>4</sub>.

Con el propósito de caracterizar el metabolismo de los eicosanoides en esta línea celular, tras cultivarla en medio completo y privarla de suero durante 24 horas, determinamos por RT-PCR, la expresión del RNAm de los principales genes de esta ruta biosintética, y mediante ELISA, la producción de eicosanoides en los sobrenadantes de los cultivos. Así, pudimos observar que en condiciones basales, las células RMC 85/4 expresaban el RNAm de COX-1, COX-2 y 12/15-LO, pero no fuimos capaces de detectar expresión de la 5-LO. En cuanto a los eicosanoides, estas células liberan al medio, por orden de mayor a menor cantidad, PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>, 12-HETE, 8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , cisteinil-LTs y LTB<sub>4</sub>. Cabe destacar que en estas muestras no fuimos capaces de detectar cantidades significativas de LXA<sub>4</sub>.

2. Celecoxib redujo de forma significativa la producción de PGE<sub>2</sub> y 8-epi-PGF<sub>2</sub> en las células RMC 85/4.

Al incubar a estas células con celecoxib (3  $\mu$ M) durante 16 horas y analizar por ELISA la producción de eicosanoides en sus sobrenadantes, pudimos observar que celecoxib redujo de forma significativa los niveles de PGE<sub>2</sub> y de 8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , sin modificar los niveles de los otros eicosanoides evaluados.

3. La albúmina, por sí sola, redujo significativamente la producción de PGE<sub>2</sub> y aumentó la de 12-HETE y cisteinil-LTs en las RMC 85/4.

Al incubar las células RMC 85/4 en presencia de albúmina (10 mg/ml) durante 16 horas, observamos que esta molécula ejercía sus efectos principalmente sobre la ruta de la COX y la LO. En concreto, observamos un descenso significativo en los niveles de PGE<sub>2</sub> y un marcado aumento en los de 12-HETE y cisteinil-LTs. Por el contrario, la albúmina no modificó los niveles de TXB<sub>2</sub>, 8-epi-PGF<sub>2α</sub> ni LTB<sub>4</sub> producidos por las RMC 85/4.

4. Celecoxib, en presencia de albúmina, disminuyó significativamente la producción de PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> y el aumento de 12-HETE inducido por la albúmina.

Los experimentos de la coincubación de celecoxib y albúmina se diseñaron de forma que, en primer lugar se incubaron las células con el inhibidor selectivo en medio sin suero y, posteriormente, tras 20 minutos, se añadió la albúmina al medio. La combinación de celecoxib y albúmina redujo de forma significativa los niveles de PGE<sub>2</sub> y TXB<sub>2</sub>, y además amortiguó el aumento de 12-HETE inducido por la albúmina, sin llegar no obstante, a los valores basales.

5. La albúmina por sí sola, o en combinación con celecoxib, redujo de forma significativa la liberación de renina por las RMC 85/4.

Quisimos evaluar si celecoxib ejercía algún efecto sobre el sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), y para ello nos planteamos determinar mediante ELISA la producción de renina de estas células mesangiales. Así, pudimos observar que celecoxib por sí solo, no tuvo efecto sobre los niveles basales, mientras que la albúmina, bien sola o bien en combinación con celecoxib, redujo significativamente la liberación de renina por las células RMC 85/4.

6. Celecoxib incrementó la actividad del PPAR $\gamma$  de forma significativa y dependiente de la concentración, y además no modificó el efecto agonista de la 15d-PGJ<sub>2</sub>. Por el contrario, la albúmina inhibió la activación del PPAR $\gamma$  y abolió el efecto de la 15d-PGJ<sub>2</sub>.

Para testar los efectos de celecoxib sobre el PPAR $\gamma$ , co-transfectamos de forma transitoria a las RMC 85/4 con los plásmidos PPAR $\gamma$ -GAL4 y tk-luc, y las incubamos

durante 16 horas con celecoxib a diferentes concentraciones (3 y 10  $\mu\text{M}$ ). Estos ensayos permitieron ver que celecoxib aumentaba significativamente y de forma concentración-dependiente la actividad del PPAR $\gamma$ . Al incubar las células transfectadas con celecoxib en presencia del agonista natural del PPAR $\gamma$ , la 15d-PGJ $_2$  (1  $\mu\text{M}$ ), se observó que el inhibidor selectivo de la COX-2 no modificaba el efecto activador de la 15d-PGJ $_2$ , ni aún aumentando la concentración del mismo.

Quisimos testar también el efecto de la albúmina, y observamos que ésta inhibía la activación del PPAR $\gamma$ , y además abolía de forma dependiente de la concentración, la respuesta del PPAR $\gamma$  a la 15d-PGJ $_2$ .

#### 7. Celecoxib y albúmina potencian el efecto inhibitor de la 15d-PGJ $_2$ sobre la expresión de $\alpha$ -SMA en las células RMC 85/4.

Con el propósito de extender nuestro estudio de celecoxib a otras patologías, investigamos los efectos de este inhibidor sobre la expresión de la  $\alpha$ -SMA, la cual se considera un marcador fenotípico de activación de la célula mesangial, que se ha encontrado sobreexpresado en otras complicaciones renales diferentes del síndrome hepatorenal. Para ello, se incubaron las células mesangiales en presencia de celecoxib (10  $\mu\text{M}$ ), 15d-PGJ $_2$  (1 y 10  $\mu\text{M}$ ), albúmina (10 mg/ml), y las respectivas combinaciones, durante 18 horas, tras las cuales se realizó la extracción de la proteína total y se realizó el Western Blot con un anticuerpo monoclonal de ratón específico para la  $\alpha$ -SMA. Celecoxib por sí solo no modificó la expresión de  $\alpha$ -SMA, pero potenció el efecto inhibitor que ejerce la 15d-PGJ $_2$  y la albúmina sobre este marcador.





## The selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib modulates the formation of vasoconstrictor eicosanoids and activates PPAR $\gamma$ . Influence of albumin<sup>☆</sup>

Marta López-Parra<sup>1</sup>, Joan Clària<sup>1,\*</sup>, Esther Titos<sup>1</sup>, Anna Planagumà<sup>1</sup>, Marcelina Párrizas<sup>2</sup>, Jaime L. Masferrer<sup>3</sup>, Wladimiro Jiménez<sup>2</sup>, Vicente Arroyo<sup>4</sup>, Francisca Rivera<sup>2</sup>, Joan Rodés<sup>4</sup>

<sup>1</sup>DNA Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain

<sup>2</sup>Hormonal Laboratory, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain

<sup>3</sup>Pfizer Research and Development, St Louis, MO, USA

<sup>4</sup>Liver Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain

**Background/Aims:** Selective cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors do not adversely affect renal function in experimental cirrhosis. In the current study, we investigated the molecular mechanisms underlying the effects of the selective COX-2 inhibitor, celecoxib, and assessed the influence of albumin on its actions.

**Methods:** Rat mesangial cells (RMC) were incubated with celecoxib in the absence or presence of albumin, and levels of selected vasoconstrictor eicosanoids, renin release and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) expression were determined. The effects of celecoxib on PPAR $\gamma$  were assessed in RMC co-transfected with PPAR $\gamma$  and luciferase reporter constructs.

**Results:** Under resting conditions, RMC expressed COX-1, COX-2 and 12/15-lipoxygenase and mainly generated prostaglandin (PG)E<sub>2</sub>, thromboxane (TX)B<sub>2</sub>, 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) and 8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Celecoxib, in addition to reducing PGE<sub>2</sub>, significantly decreased 8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  formation. In the presence of albumin, celecoxib also reduced TXB<sub>2</sub> and 12-HETE. Albumin per se inhibited PGE<sub>2</sub> as well as renin release. In trans-activation assays, celecoxib acted as a PPAR $\gamma$  agonist whereas albumin inhibited PPAR $\gamma$  as well as 15d-PGJ<sub>2</sub>-induced PPAR $\gamma$  activation. Finally, celecoxib and albumin potentiated the inhibitory effect of 15d-PGJ<sub>2</sub> on  $\alpha$ -SMA expression.

**Conclusions:** These data provide novel molecular mechanisms of celecoxib and their modulation by albumin, that may be relevant to prevent renal dysfunction in conditions of unbalanced effective blood volume.

© 2004 Published by Elsevier B.V. on behalf of the European Association for the Study of the Liver.

**Keywords:** Cyclooxygenase-2; PPAR $\gamma$ ; Albumin; Prostaglandins; Renin; 8-Isoprostanes

Received 11 June 2004; received in revised form 27 August 2004; accepted 21 September 2004; available online 7 October 2004

<sup>☆</sup> The authors state that they did not receive funding from the drug manufacturers of the study. However, they state that one author, Jaime L. Masferrer, is an employee of the company.

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 2275400x2814; fax: +34 93 2275454.

E-mail address: jclaria@clinic.ub.es (J. Clària).

### 1. Introduction

Selective cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors effectively inhibit inflammation while sparing physiologic prostaglandin (PG) production [1,2]. This new class of anti-inflammatory drugs are of interest in diseases such as decompensated cirrhosis, in which, renal function is critically dependent on PGs and the administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is frequently associated with acute renal failure [3]. In fact, recent studies have demonstrated that, unlike conventional NSAIDs, selective COX-2 inhibitors do not impair

renal function in rats with experimental cirrhosis and ascites [4,5].

Although, the mechanism of action of selective COX-2 inhibitors is based on its ability to inhibit the formation of COX-2-derived PGs, additional actions cannot be excluded. Recent reports have shown that these compounds regulate the binding of transcriptional factors such as NF- $\kappa$ B and AP-1 [6], inhibit the phosphorylation of protein kinase B/Akt [7,8], block the activity and nuclear translocation of ERK2 [9] and induce apoptosis via a novel mitochondrial pathway [10]. Moreover, we have recently demonstrated that selective COX-2 inhibitors are able to modulate inflammatory genes such as cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1, a member of the interleukin-8 family [11]. These findings are consistent with an emerging appreciation that the full spectrum of properties of these compounds has only been partially appreciated.

In the current study, we investigated the molecular mechanisms of the selective COX-2 inhibitor, celecoxib, in rat mesangial cells. Mesangial cells constitute a useful cellular model to explore the renal actions of celecoxib because these myofibroblasts are essential for maintaining the structural, glomerular and immunological functions of the kidneys and are the main producers of vasoactive and inflammatory mediators including eicosanoids [12]. In these cells, we firstly assessed the effects of celecoxib on the biosynthesis of eicosanoids, specially on those carrying vasoactive properties such as PGE<sub>2</sub>, thromboxane (TX) B<sub>2</sub>, 8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (8-isoprostane), 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) and cysteinyl-leukotrienes (Cys-LTs) [13,14]. Secondly, we explored whether, similar to other anti-inflammatory compounds, celecoxib is able to bind and activate PPAR $\gamma$  [15–17]. Finally, in order to further extend our investigation on celecoxib to renal complications other than the hepatorenal syndrome, we assessed the effects of celecoxib on  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) expression, a well established marker of mesenchymal cell de-differentiation and activation [12,18].

In addition to studying the molecular mechanisms of celecoxib, we also explored the effects of albumin. Albumin is a major protein component with remarkable biological effects [19]. For instance, albumin is a generic stabilizing protein, a major contributor to osmotic pressure, is involved in the maintenance of blood pH and protects cells from injury [20–22]. Moreover, albumin has been shown to bind many fatty acids and NSAIDs and to be a major determinant of eicosanoid formation in platelets and leukocytes [23–27]. On the basis of these observations and considering that cirrhotic patients may require anti-inflammatory therapy while receiving albumin (which is clinically used as a plasma expander for preventing post-paracentesis circulatory dysfunction and for reducing the incidence of renal impairment [28,29]), we questioned whether the molecular actions of celecoxib are influenced by this protein.

## 2. Material and methods

### 2.1. Cell culture

Rat RMC 85/4 cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, L-glutamine (2 mM), penicillin (50 U/ml) and streptomycin (50  $\mu$ g/ml) at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. This established rat mesangial cell line was provided by Dr. M. Martin (University of Hannover) who obtained it from a cell preparation from glomerular outgrowths of male Sprague–Dawley rats after 6 months of culture in the presence of 20% FCS [30,31]. The mesangial phenotype of RMC 85/4 cultures was routinely characterized by optical visualization and immunocytochemistry showing positive staining for desmin and vimentin and negative staining for cytokeratin and factor VIII (Fig. 1(A)).

### 2.2. Cell incubations

RMC 85/4 cells were serum-deprived for 24 h, exposed to vehicle (0.1% ethanol) or the selective COX-2 inhibitor, celecoxib, (3  $\mu$ M) for 20 min and subsequently incubated in the presence or absence of albumin (Cohn V fraction, fatty acid-depleted, 10 mg/ml) for 16 h at 37 °C.

### 2.3. RT-PCR

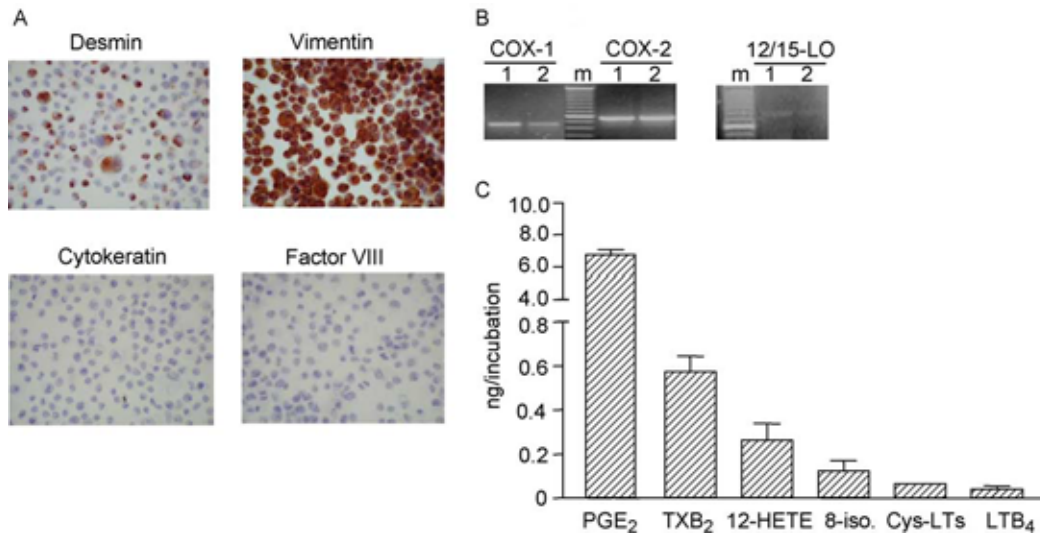
RNA was isolated by using the trizol reagent. PCR was performed using oligonucleotides specific for rat COX-1, COX-2, 5-LO, 12/15-LO, PPAR $\gamma$  and GAPDH (GenBank Accession Numbers NM\_017043, NM\_017232, NM\_012822, NM\_031010, NM\_013124 and NM\_017008, respectively). COX-1, COX-2, PPAR $\gamma$  and GAPDH were amplified at 96 °C (30 s), 60 °C (1 min) and 72 °C (1 min) for 35 cycles. 5-LO and 12/15-LO were amplified for 35 cycles at 94 °C (30 s), 58 °C (1 min) and 72 °C (30 s) and 94 °C (30 s), 56 °C (45 s) and 72 °C (1 min), respectively. PCR products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining.

### 2.4. Analysis of eicosanoids and renin levels

PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>, 12-HETE, Cys-LTs, LTB<sub>4</sub>, lipoxin A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>) and renin levels were determined in unextracted supernatants of RMC 85/4 cells by specific enzymeimmunoassays (EIAs) (Amersham, Buckinghamshire, UK; DRG Instruments, Marburg, Germany; Cayman, Ann Arbor, MI; Neogen, Lexington, KY and DiaSorin, Stillwater, MN, respectively). 8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  levels were determined by EIA after extraction of supernatants in 8-isoprostane affinity columns (Cayman, Ann Arbor, MI).

### 2.5. PPAR $\gamma$ trans-activation assay

A fusion protein containing the yeast GAL4 DNA-binding domain linked to the ligand-binding domain of PPAR $\gamma$  (PPAR $\gamma$ -GAL4 plasmid) and a luciferase reporter construct containing four copies of a GAL4 upstream activating sequence (UAS<sub>G</sub>) and a thymidine kinase (tk) promoter (MH100-tk-luc plasmid) were kindly provided by Dr R. Evans (Salk Institute). This chimeric PPAR $\gamma$  activates transcription through a heterologous response element and allows PPAR $\gamma$  activity to be assayed independently of endogenous receptors [32]. Transient transfections in mesangial cells were conducted by using the Effectene<sup>®</sup> transfection reagent (Qiagen, Hilden, Germany) in a ratio 1:10 to DNA. Briefly, a total of  $5.0 \times 10^4$  RMC 85/4 were seeded in each well of 12-well plates and when cells reached 70% confluence were incubated in RPMI 1640 containing 0.3  $\mu$ g of the luciferase reporter construct MH100-tk-luc, 0.1  $\mu$ g of PPAR $\gamma$ -GAL4 and 0.025  $\mu$ g of  $\beta$ -galactosidase expression vector pCMV (an internal control plasmid containing a cytomegalovirus promoter). After 42 h of incubation, cells were washed twice with DPBS and treated with vehicle (0.5% ethanol), 15d-PGJ<sub>2</sub> (1  $\mu$ M), celecoxib (3 and 10  $\mu$ M) and albumin (1 and 10 mg/ml) for another 18 h in serum-free RPMI 1640 medium. Cells were then harvested in luciferase lysis buffer and light units from firefly luciferase and  $\beta$ -galactosidase activities measured in a Lumat LB 9507 luminometer (Berthold, Bad Wildbad, Germany). Relative luciferase activity was obtained by normalizing the luciferase activity



**Fig. 1.** Immunocytochemical characterization and profile of eicosanoids formed by rat RMC 85/4 cells. (A) Expression of characteristic cellular markers of mesangial cells. Cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS and characterized by immunocytochemistry using specific antibodies against desmin, vimentin, cytokeratin and factor VIII. (B) Detection of COX-1, COX-2 and 12/15-LO mRNA expression by RT-PCR. RNA was reverse-transcribed and COX-1, COX-2 and 12/15-LO amplified by PCR. Representative results obtained from two separate samples (samples 1 and 2) are shown in this ethidium bromide-stained gel; *m*, size marker (100-base pair DNA ladder). (C) Generation of arachidonic acid metabolites. Eicosanoid levels in supernatants from RMC 85/4 cells growing in serum-free RPMI 1640 medium for 24 h were determined by EIA. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of three different experiments with duplicate determinations. 8-iso, 8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> .

against the internal control  $\beta$ -galactosidase activity. Results were presented as 'fold induction' relative to the vehicle control values.

### 2.6. $\alpha$ -Smooth muscle actin protein expression

RMC 85/4 cells growing in serum-free medium were incubated with vehicle (0.5% ethanol), 15d-PGJ<sub>2</sub> (1 and 10  $\mu$ M), celecoxib (3 and 10  $\mu$ M) and albumin (10 mg/ml) for 18 h at 37 °C. At the end of the incubation, total protein was extracted and equal amounts of protein (10  $\mu$ g) were resuspended in SDS-containing Laemmli sample buffer, heated at 100 °C for 5 min, electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred overnight to PVDF membranes. Gels were stained with Coomassie blue to visualize loading differences and membranes were submitted to Ponceau S staining to monitor the efficiency of the transfer. The blots were subsequently blocked for 1 h in tris-buffered saline (20 mM tris/HCl pH 7.4 and 0.5 M NaCl) containing 5% non-fat dry milk and 0.5% Tween 20, followed by incubation for 2 h with a mouse monoclonal antibody specific for  $\alpha$ -SMA (1:5000 dilution) (Sigma, St Louis, MO). After extensive washes, the blots were incubated for 1 h at room temperature with a sheep anti-mouse secondary antibody conjugated to

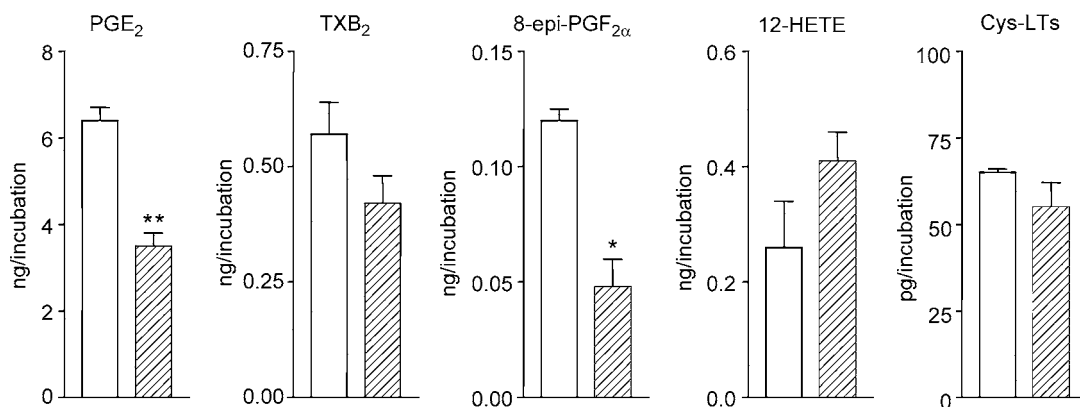
horseradish peroxidase (1:10000 dilution) and bands visualized by an enhanced chemiluminescence detection system.

Statistical analysis of the results was performed using the unpaired Student's *t*-test and differences considered significant at  $P < 0.05$ .

### 3. Results

Under resting conditions, RMC 85/4 cells constitutively expressed COX-1, COX-2 and 12/15-LO (Fig. 1(B)) and mainly generated PGE<sub>2</sub> together with lower quantities of TXB<sub>2</sub>, 12-HETE, 8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , Cys-LTs and LTB<sub>4</sub> (Fig. 1(C)). LXA<sub>4</sub> was not detected in these samples.

We next assessed the effects of the selective COX-2 inhibitor, celecoxib, on the formation of vasoactive eicosanoids, namely PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>, 8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , 12-HETE and Cys-LTs by RMC 85/4 cells. As shown in Fig. 2,



**Fig. 2.** Effects of the selective COX-2 inhibitor, celecoxib, on eicosanoid formation in rat RMC 85/4 cells. Cells were exposed to vehicle (empty bars) or celecoxib (3  $\mu$ M) (dashed bars) for 16 h at 37 °C and eicosanoid levels measured in cell supernatants by specific EIAs. Results represent the mean  $\pm$  SEM of 3–6 different experiments with duplicate determinations. \* $P < 0.01$  and \*\* $P < 0.005$  versus vehicle.

**Table 1**  
**Influence of albumin on the actions of the selective COX-2 inhibitor, celecoxib, on eicosanoid formation in rat RMC 85/4 cells**

	PGE <sub>2</sub>	TXB <sub>2</sub>	8-epi-PGF <sub>2α</sub>	12-HETE	Cys-LTs
Vehicle	6.4 ± 0.3	0.57 ± 0.07	0.12 ± 0.005	0.26 ± 0.08	0.065 ± 0.01
Albumin	4.5 ± 0.1**	0.51 ± 0.05	0.12 ± 0.02	1.17 ± 0.07***	0.177 ± 0.07***
Celecoxib + albumin	2.9 ± 0.3***	0.37 ± 0.05*	ND	0.70 ± 0.09*** <sup>a</sup>	0.166 ± 0.03***

RMC 85/4 cells were exposed to vehicle (0.1% ethanol), albumin (10 mg/ml) and combinations of celecoxib (3 μM) with albumin (10 mg/ml) for 16 h at 37 °C and levels of PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>, 8-epi-PGF<sub>2α</sub>, 12-HETE and Cys-LTs were measured in cell supernatants by specific EIAs. The results represent the mean ± SEM of 3–6 different experiments with duplicate determinations. Values are given as ng/incubation. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.025, \*\*\**P* < 0.005 versus vehicle.

<sup>a</sup> *P* < 0.005 for celecoxib + albumin versus albumin. ND, not determined.

celecoxib significantly decreased PGE<sub>2</sub> and 8-epi-PGF<sub>2α</sub> concentrations without modifying TXB<sub>2</sub>, 12-HETE and Cys-LT biosynthesis. Celecoxib did not modify LTB<sub>4</sub> biosynthesis (from 40 ± 9 to 46 ± 1 pg/incubation).

We also examined how the effects of celecoxib on arachidonic acid metabolism in RMC 85/4 cells were influenced by the presence of albumin in the culture medium. Albumin had a major impact on the COX and LO pathways since this protein significantly inhibited PGE<sub>2</sub> and markedly increased 12-HETE and Cys-LTs (Table 1). Albumin did not affect TXB<sub>2</sub> and 8-epi-PGF<sub>2α</sub>. In the presence of albumin, celecoxib, in addition to inhibiting PGE<sub>2</sub>, it also induced inhibition of TXB<sub>2</sub> formation (Table 1). Interestingly, celecoxib significantly inhibited the increase in 12-HETE production induced by albumin (Table 1). LTB<sub>4</sub> levels were not modified by albumin either alone or in combination with celecoxib (from 40 ± 9 to 25 ± 11 and to 37 ± 14 pg/incubation).

We next evaluated whether celecoxib modulates the renin–angiotensin system by testing the effects of this compound on renin release in RMC 85/4 cells. As shown in Fig. 3, celecoxib did not modify renin release. Conversely, a significant reduction in renin release was observed with albumin alone or in combination with celecoxib (Fig. 3).

To assess the effects of celecoxib on PPARγ, we transiently co-transfected RMC 85/4 cells with PPARγ-GAL4 and luciferase reporter constructs. Since, PPARγ is constitutively expressed in RMC 85/4 cells (data not shown), this strategy allowed us the measurement of PPARγ activity without interference from the endogenous receptor. As shown in Fig. 4(A), celecoxib significantly increased, in a concentration-dependent fashion, PPARγ activity. Celecoxib did not alter the agonistic effect of the PPARγ natural ligand, 15d-PGJ<sub>2</sub> (Fig. 4(B)). Interestingly, a significant inhibition of PPARγ activity was exerted by albumin (Fig. 4(C)), which in addition, abolished, in a concentration-dependent manner, the response of PPARγ to 15d-PGJ<sub>2</sub> (Fig. 4(D)).

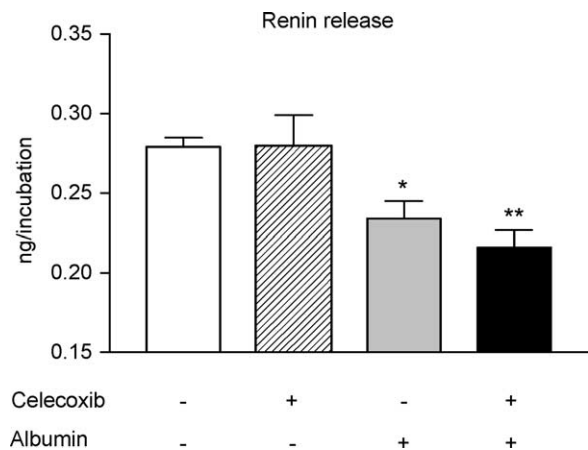
Fig. 5 shows the effects of celecoxib on α-SMA expression in RMC 85/4 cells and their modulation by albumin and 15d-PGJ<sub>2</sub>. Celecoxib at concentrations of 10 μM had no effect on α-SMA protein levels (Fig. 5). Similar findings were obtained with lower concentrations of celecoxib (i.e. 3 μM) (data not shown). In contrast, the expression of α-SMA was significantly decreased by

albumin, either alone or in combination with celecoxib and 15d-PGJ<sub>2</sub> (Fig. 5). A significant inhibition of α-SMA was observed with high (10 μM) but not low (1 μM) concentrations of 15d-PGJ<sub>2</sub> (Fig. 5). Interestingly, celecoxib potentiated the effect of this cyclopentenone PG, since a significant inhibition in α-SMA was observed following the addition of this selective COX-2 inhibitor together with lower concentrations of 15d-PGJ<sub>2</sub> (Fig. 5).

#### 4. Discussion

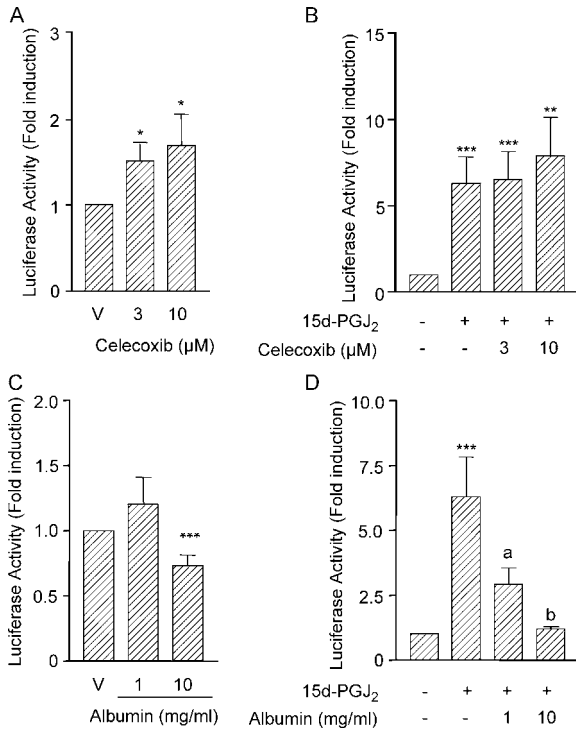
Celecoxib is a selective COX-2 inhibitor with proven anti-inflammatory and analgesic efficacy and low gastrointestinal toxicity compared with conventional NSAIDs [1,2]. The pharmacological properties of celecoxib are based on its ability to inhibit COX-2, but the complete mechanism of action is poorly understood. The results of the current study indicate that, in addition to its primary inhibitory action on COX-2 and PG formation, celecoxib also modulates the biosynthesis of vasoconstrictor eicosanoids and is able to bind and activate PPARγ.

Our results demonstrate that RMC 85/4 cells mainly convert arachidonic acid into COX-derived products



**Fig. 3.** Effects of the selective COX-2 inhibitor, celecoxib, on renin release by rat RMC 85/4 cells. Cells were exposed to vehicle or celecoxib (3 μM) for 16 h at 37 °C in the absence or presence of albumin (10 mg/ml) and renin concentrations in cell supernatants determined by EIA. Results represent the mean ± SEM of three different experiments with duplicate measurements. \**P* < 0.025 and \*\**P* < 0.01 versus vehicle.



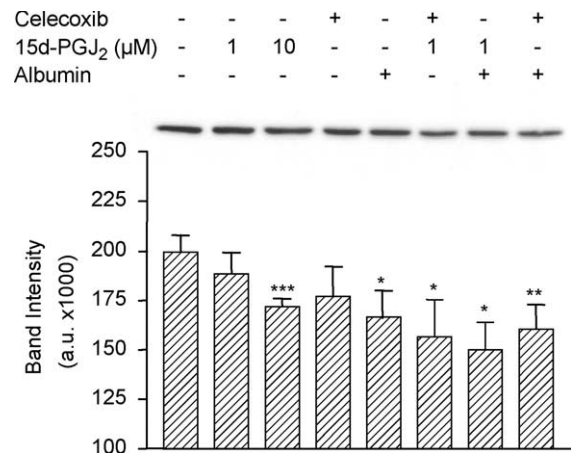


**Fig. 4.** Effects of the selective COX-2 inhibitor, celecoxib, on PPAR $\gamma$  in RMC 85/4 cells. Cells were co-transfected with PPAR $\gamma$ -GAL4, luciferase and pCMV- $\beta$ Gal plasmids and treated for 18 h with increasing concentrations of celecoxib (3 and 10  $\mu$ M) (A), albumin (1 and 10 mg/ml) (C) and combinations of 15d-PGJ<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) with celecoxib (3 and 10  $\mu$ M) (B) or albumin (1 and 10 mg/ml) (D). Luciferase values were normalized to the level of  $\beta$ -galactosidase activity and results plotted as fold activation relative to untreated cells (vehicle, V) arbitrarily set to a value of 1. Results are the mean  $\pm$  SEM of five different experiments. \* $P$  < 0.025, \*\* $P$  < 0.01 and \*\*\* $P$  < 0.005 versus vehicle. <sup>a</sup> $P$  < 0.01 and <sup>b</sup> $P$  < 0.025 versus 15d-PGJ<sub>2</sub>.

and 12-HETE. Although, we were not able to detect 5-LO expression in RMC 85/4 cells (data not shown), minor quantities of Cys-LTs and LTB<sub>4</sub> were found in their supernatants. These findings are consistent with previous studies implying the presence of 5-LO activity in rat glomeruli [33]. It must be taken into consideration that our results reflect eicosanoid formation by non-dividing cells since cells were grown in serum-deprived medium for 24 h. On the other hand, RMC 85/4 cells also generated detectable amounts of the free radical-catalyzed product of arachidonic acid, 8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (8-isoprostane). Isoprostanes are PG isomers that, unlike the enzymatic products of COX, are initially formed in situ in the phospholipid domain by free radical-mediated peroxidation [34]. Indeed, isoprostanes are reliable and specific markers of non-enzymatic lipid peroxidation [34]. Since, COX-2 by itself has been postulated as a source not only of 8-isoprostanes but also of oxygen radicals [35,36], the inhibitory actions of celecoxib on these eicosanoids could reflect either a direct inhibition of COX-2-dependent 8-isoprostane biosynthesis or a reduction in oxidative stress levels or both mechanisms.

A major finding of the current study was that albumin modulated eicosanoid biosynthesis, celecoxib actions and renin release in RMC 85/4 cells. In fact, in these cells, albumin significantly inhibited PGE<sub>2</sub> levels and markedly increased 12-HETE and Cys-LT formation. These changes are consistent with earlier observations demonstrating that albumin diverts free arachidonate to lipoxygenation [24]. In our study, albumin also influenced celecoxib actions. Albumin is the most abundant protein in plasma and is extremely important from a biopharmacological point of view because it is the major transporter of non-esterified fatty acids as well as of different drugs and metabolites. There is a growing body of evidence that albumin binds NSAIDs and influences their pharmacokinetic properties [37]. Moreover, celecoxib is extensively protein bound, primarily to albumin [38]. Therefore, although our incubations were carried out in serum-deprived medium and cells were exposed to celecoxib for 20 min before the addition of albumin, we cannot rule out the possibility that the observed effects are secondary to binding of celecoxib to albumin. These findings together with the observation that albumin reduced renin release in RMC 85/4 cells, support the notion that albumin displays remarkable biological properties.

A finding of interest is that celecoxib activated PPAR $\gamma$  in RMC 85/4 cells. Moreover, celecoxib did not alter the stimulatory actions of 15d-PGJ<sub>2</sub>, a cyclopentenone PG resulting from the dehydration of PGD<sub>2</sub> and a natural ligand and potent activator of PPAR $\gamma$  [32]. Interestingly, the metabolism of PGD<sub>2</sub> to form 15d-PGJ<sub>2</sub> is catalyzed in vitro by albumin [39]. In our cell-based reporter assay, albumin



**Fig. 5.** Effects of the selective COX-2 inhibitor, celecoxib, on  $\alpha$ -SMA protein expression in rat RMC 85/4 cells. Cells were exposed to vehicle, 15d-PGJ<sub>2</sub> (1 and 10  $\mu$ M), celecoxib (10  $\mu$ M), albumin (10 mg/ml) and combinations of 15d-PGJ<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) with either celecoxib (10  $\mu$ M) or albumin (10 mg/ml) for 18 h at 37  $^{\circ}$ C. Expression of  $\alpha$ -SMA was analyzed by Western blot and band intensities determined by scanning densitometry. This figure shows a representative blot and the mean  $\pm$  SEM of four different experiments. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.020 and \*\*\* $P$  < 0.01 versus vehicle.

significantly inhibited the induction of PPAR $\gamma$  by 15d-PGJ<sub>2</sub>, an effect previously reported by Person et al. [40]. Our results differ from those previously reported by Yamazaki et al. [8] and Kusunoki et al. [41] who failed to demonstrate transcriptional activation of PPAR $\gamma$  in the luciferase reporter gene assay in response to celecoxib and NS-398. Whether differences in cell type and/or methodology may explain these controversial findings remain, at present, unknown. Taken together, the finding that celecoxib binds and activates PPAR $\gamma$  is of importance for the understanding of the molecular mechanisms of celecoxib. Thus, similar to conventional NSAIDs, which also bind PPAR $\gamma$  [15–17], the pharmacological properties of celecoxib are mediated, at least in part, by activation of this nuclear receptor.

Our data are of clinical interest and may be relevant for disease states with altered effective blood volume. In this regard, our investigation is particularly pertinent to the pathogenesis of renal complications in patients with decompensated liver cirrhosis in which the renal effects of selective COX-2 inhibitors are still a matter of discussion. For instance, it is well established that renal function in cirrhosis depends upon a critical equilibrium between the activity of endogenous vasoconstrictor systems and the renal production of vasodilator PGs. Given that celecoxib, in addition to inhibiting PGs also reduces the formation of 8-isoprostanes, TXB<sub>2</sub> and 12-HETE, which are potent renal vasoconstrictors [14,42–44], this selective COX-2 inhibitor is expected, in theory, to produce less renal side effects than conventional NSAIDs. In fact, a recent double-blind, randomized, placebo-controlled study in patients with cirrhosis and ascites has shown that celecoxib does not impair renal function to a similar extent than the NSAID, naproxen [45]. On the other hand, the modulation of  $\alpha$ -SMA expression by celecoxib and albumin extends our results to clinical scenarios other than cirrhosis and ascites, in which impairment of renal function is largely determined by overexpression of this phenotypic marker of mesangial cell activation [12,18]. Overall, the in vitro results reported herein provide evidence for novel mechanisms of action underlying the biological effects of celecoxib and albumin in renal cells and provide support for additional evaluation of these compounds in vivo.

## Acknowledgements

We thank Dr M. Martin (Medical School of Hannover, Germany) for the RMC 85/4 cells and Dr R. Evans (Salk Institute, La Jolla, USA) for providing the PPAR $\gamma$  constructs. Supported in part by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF03/0586) and Instituto de Salud Carlos III (C03/02).

## References

- [1] Marnett LJ, Kalgutkar AS. Cyclooxygenase 2 inhibitors: discovery, selectivity and the future. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:465–469.
- [2] McMurray RW, Hardy KJ. Cox-2 inhibitors: today and tomorrow. *Am J Med Sci* 2002;323:181–189.
- [3] Clària J, Arroyo V. Prostaglandins and other cyclooxygenase-dependent arachidonic acid metabolites and the kidney in liver disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2003;72:19–33.
- [4] Bosch-Marcé M, Clària J, Titos E, Masferrer JL, Altuna R, Poo JL, et al. Selective inhibition of cyclooxygenase 2 spares renal function and prostaglandin synthesis in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* 1999;116:1167–1175.
- [5] López-Parra M, Clària J, Planagumà A, Titos E, Masferrer JL, Woerner BM, et al. Cyclooxygenase-1 derived prostaglandins are involved in the maintenance of renal function in rats with cirrhosis and ascites. *Br J Pharmacol* 2002;135:891–900.
- [6] Niederberger E, Tegeder I, Vetter G, Schmidtko A, Schmidt H, Euchenhofer C, et al. Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF-kappaB. *FASEB J* 2001;15:1622–1624.
- [7] Hsu AL, Ching TT, Wang DS, Song X, Rangnekar VM, Chen CS. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem* 2000;275:11397–11403.
- [8] Yamazaki R, Kusunoki N, Matsuzaki T, Hashimoto S, Kawai S. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors show a differential ability to inhibit proliferation and induce apoptosis of colon adenocarcinoma cells. *FEBS Lett* 2002;531:278–284.
- [9] Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin E, Itani RM, Sarfeh IJ, et al. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med* 1999;5:1418–1423.
- [10] Jendrossek V, Handrick R, Belka C. Celecoxib activates a novel mitochondrial apoptosis signaling pathway. *FASEB J* 2003;17:1547–1549.
- [11] Planagumà A, Titos E, López-Parra M, Gaya J, Pueyo G, Arroyo V, et al. Aspirin (ASA) regulates 5-lipoxygenase activity and peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated CINC-1 release in rat liver cells: novel actions of lipoxin A4 (LXA4) and ASA-triggered 15-epi-LXA4. *FASEB J* 2002;16:1937–1939.
- [12] Tisher CC, Madsen KM. Anatomy of the kidney. In: Brenner BM, Rector FC, editors. *The kidney*. Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 1991. p. 3–75.
- [13] Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* 1987;237:1171–1176.
- [14] Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert J, Morrow JD, Roberts LJ, et al. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A2 receptors. *J Clin Invest* 1992;90:136–141.
- [15] Jaradat MS, Wongsud B, Phornchirasilp S, Rangwala SM, Shams G, Sutton M, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor isoforms and inhibition of prostaglandin H(2) synthases by ibuprofen, naproxen, and indomethacin. *Biochem Pharmacol* 2001;62:1587–1595.
- [16] Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 1997;272:3406–3410.
- [17] Yamazaki R, Kusunoki N, Matsuzaki T, Hashimoto S, Kawai S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in association with activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in rheumatoid synovial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302:18–25.

- [18] Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 1998;339:1448–1456.
- [19] Peters Jr T. Serum albumin. *Adv Protein Chem* 1985;37:161–245.
- [20] Guyton AC, Hall JE. Human physiology and mechanisms of disease. Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 1997.
- [21] Fitzpatrick FA, Wainald MA. Albumin-lipid interactions: prostaglandin stability as a probe for characterizing binding sites on vertebrate albumins. *Biochemistry* 1981;20:6129–6134.
- [22] Zoellner H, Hofler M, Beckmann R, Hufnagl P, Vanyek E, Bielek E, et al. Serum albumin is a specific inhibitor of apoptosis in human endothelial cells. *J Cell Sci* 1996;109:2571–2580.
- [23] Benz M, Werz O, Jacob R, Steinhilber D. pH-Dependent regulation of leukocyte 5-lipoxygenase activity in inflammatory exudates by albumin. *Inflamm Res* 1997;46:366–372.
- [24] Broekman MJ, Eiroa AM, Marcus AJ. Albumin redirects platelet eicosanoid metabolism toward 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid. *J Lipid Res* 1989;30:1925–1932.
- [25] Dadaian M, Granstrom E, Westlund P. Albumin prevents metabolism of 12-hydroxyeicosatetraenoic acid by leukocytes in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1996;1303:154–160.
- [26] Ek BA, Cistola DP, Hamilton JA, Kaduce TL, Spector AA. Fatty acid binding proteins reduce 15-lipoxygenase-induced oxygenation of linoleic acid and arachidonic acid. *Biochim Biophys Acta* 1997;1346:75–85.
- [27] Dadaian M, Westlund P. Albumin modifies the metabolism of hydroxyeicosatetraenoic acids via 12-lipoxygenase in human platelets. *J Lipid Res* 1999;40:940–947.
- [28] Ginès A, Fernández-Esparrach G, Monescillo A, Vila C, Domènech E, Abecasis R, et al. Randomized trial comparing albumin, dextran 70, and polygeline in cirrhotic patients with ascites treated by paracentesis. *Gastroenterology* 1996;111:1002–1010.
- [29] Sort P, Navasa M, Arroyo V, Aldeguer X, Planas R, Ruiz-Del-Árbol L, et al. Effect of intravenous albumin on renal impairment and mortality in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis. *N Engl J Med* 1999;341:403–409.
- [30] Martin M, Krichbaum M, Kaever V, Goppelt-Strube M, Resch K. Cyclosporin A suppresses proliferation of renal mesangial cells in culture. *Biochem Pharmacol* 1988;37:1083–1088.
- [31] Martin M, Neumann D, Hoff T, Resch K, DeWitt DL, Goppelt-Strube M. Interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 expression is suppressed by cyclosporin A in rat mesangial cells. *Kidney Int* 1994;45:150–158.
- [32] Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 1995;83:803–812.
- [33] Ardaillou R, Baud L, Sraer J. Leukotrienes and other lipoxygenase products of arachidonic-acid synthesized in the kidney. *Am J Med* 1986;81:12–22.
- [34] Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9383–9387.
- [35] Pratico D, FitzGerald GA. Generation of 8-epiprostaglandin F2alpha by human monocytes. Discriminate production by reactive oxygen species and prostaglandin endoperoxide synthase-2. *J Biol Chem* 1996;271:8919–8924.
- [36] Chenevard R, Hurlimann D, Bechir M, Enseleit F, Spieker L, Hermann M, et al. Selective COX-2 inhibition improves endothelial function in coronary artery disease. *Circulation* 2003;107:405–409.
- [37] Colmenarejo G, Álvarez-Pedraglio A, Lavandera JL. Cheminformatic models to predict binding affinities to human serum albumin. *J Med Chem* 2001;44:4370–4378.
- [38] Davies NM, McLachlan AJ, Day RO, Williams KM. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib. A selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor. *Clin Pharmacokinet* 2000;38:225–242.
- [39] Fitzpatrick FA, Wainald MA. Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D2. Identification of products formed in vitro. *J Biol Chem* 1983;258:11713–11718.
- [40] Person EC, Waite LL, Taylor RN, Scanlan TS. Albumin regulates induction of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) by 15-deoxy-delta(12–14)-prostaglandin J(2) in vitro and may be an important regulator of PPARgamma function in vivo. *Endocrinology* 2001;142:551–556.
- [41] Kusunoki N, Yamazaki R, Kawai S. Induction of apoptosis in rheumatoid synovial fibroblasts by celecoxib, but not by other selective cyclooxygenase 2 inhibitors. *Arthritis Rheum* 2002;46:3159–3167.
- [42] Morrow JD, Moore KP, Awad JA, Ravenscraft MD, Marini G, Badr KF, et al. Marked overproduction of non-cyclooxygenase derived prostanoids (F2-isoprostanines) in the hepatorenal syndrome. *J Lipid Mediat* 1993;6:417–420.
- [43] Ma YH, Harder DR, Clark JE, Roman RJ. Effects of 12-HETE on isolated dog renal arcuate arteries. *Am J Physiol* 1991;261:H451–H456.
- [44] Zipser RD, Radvan GH, Kronborg IJ, Duke R, Little TE. Urinary thromboxane-B2 and prostaglandin-E2 in the hepatorenal-syndrome. Evidence for increased vasoconstrictor and decreased vasodilator factors. *Gastroenterology* 1983;84:697–703.
- [45] Clària J, Kent JD, López-Parra M, Escolar G, Ruiz-del-Árbol L, Ginès P, et al. Effects of celecoxib and naproxen on renal function in patients with cirrhosis and ascites: a double-blind randomized controlled trial. *J Hepatol* 2004;40:3–4.

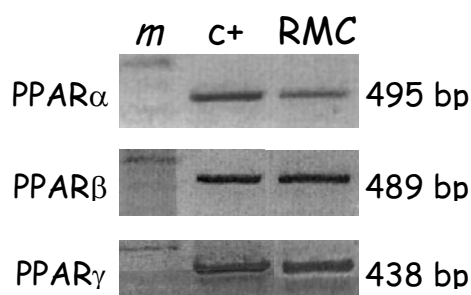




### 3. Anexo al artículo 2.

#### 3.1. En condiciones basales, las RMC 85/4 expresan el RNAm del PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ y PPAR $\gamma$ .

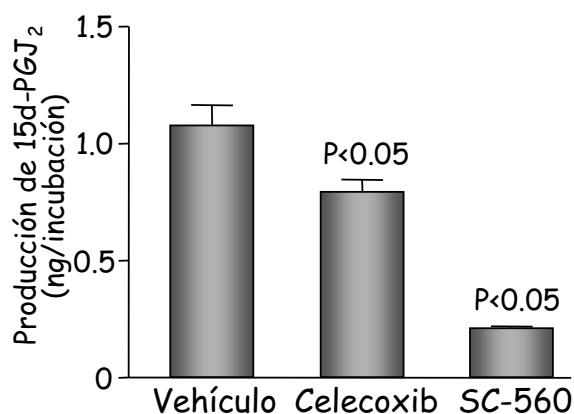
Antes de evaluar el efecto de celecoxib sobre la vía de los PPARs, quisimos investigar si las RMC 85/4 expresaban el RNAm del PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  y PPAR $\gamma$ . Tras extraer el RNA total de un cultivo de estas células incubado en medio sin suero, realizamos la RT-PCR de las muestras con *primers* específicos para cada uno de los genes, revelando que las RMC 85/4 expresaban de forma constitutiva las tres isoformas de los PPARs. En la figura 3.1 se muestran los resultados de las PCRs realizadas. Como controles positivos se utilizaron las líneas celulares CC-1 (hepatocitos de rata) para PPAR $\alpha$  y PPAR $\beta$  y CRL-2192 (macrófagos alveolares de rata) para el PPAR $\gamma$ .



**Figura 3.1. Expresión del RNAm de los PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  en la línea celular RMC 85/4.** Imagen representativa de las PCRs de las tres isoformas en RMC 85/4. Los productos de PCR se comprobaron en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. *m*, marcador de peso molecular; *c+*, control positivo; RMC, línea RMC 85/4; bp, *base pairs*.

#### 3.2. Las células RMC 85/4 en condiciones basales producen cantidades significativas de 15d-PGJ<sub>2</sub>.

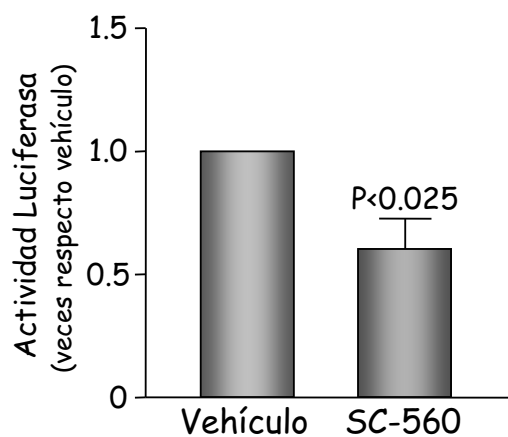
Tras incubar las células en medio sin suero, se procesó el sobrenadante para ser ensayado en un análisis de ELISA específico para 15d-PGJ<sub>2</sub>. Así pudimos determinar que esta línea celular era capaz de producir y liberar al medio, cantidades significativas de 15d-PGJ<sub>2</sub> (ver figura 3.2). Además, y tal y como se muestra en la figura 3.2, tanto la inhibición selectiva de la COX-2 mediante celecoxib, como la de COX-1 mediante SC-560, redujo de forma significativa la biosíntesis de 15d-PGJ<sub>2</sub> mediada por la línea RMC 85/4.



**Figura 3.2. Niveles de 15d-PGJ<sub>2</sub> sintetizados por las RMC 85/4.** La producción de 15d-PGJ<sub>2</sub> se determinó en los sobrenadantes de las RMC 85/4 incubadas en medio sin suero durante 24 horas, en ausencia o presencia de celecoxib (3  $\mu$ M) o SC-560 (3  $\mu$ M). Los resultados se expresan como media  $\pm$  media error estándar de 2 experimentos diferentes.

### 3.3. El inhibidor selectivo de la COX-1, SC-560, inhibe de forma significativa la activación transcripcional del PPAR $\gamma$ .

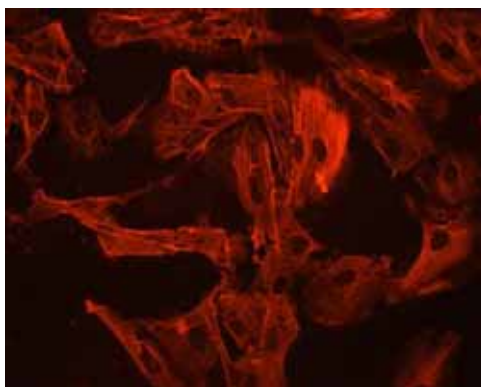
Los experimentos de transactivación realizados con celecoxib, también se llevaron a cabo con SC-560 (3  $\mu$ M). Estos ensayos permitieron ver que dicho compuesto ejercía el efecto contrario que celecoxib, es decir, inhibía la actividad transcripcional del PPAR $\gamma$ .



**Figura 3.3. Efecto del inhibidor selectivo de la COX-1, SC-560 sobre la activación del PPAR $\gamma$ .** Las células co-transfectadas con los plásmidos PPAR $\gamma$ -Gal4, luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa, se incubaron durante 18 horas con SC-560 (3  $\mu$ M). Los valores de la luciferasa se normalizaron con respecto a los de la actividad  $\beta$ -galactosidasa y se representó como número de veces que se activan con respecto a las muestras sin tratar (vehículo) que arbitrariamente se fijó en el valor de 1. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  media error estándar de 4 experimentos diferentes.

### 3.4. Inmunocitoquímica de la $\alpha$ -SMA en la línea celular RMC 85/4.

En el artículo 2 de esta tesis se demostraba mediante la técnica de Western Blot, que las RMC 85/4 expresaban en condiciones basales la proteína de la  $\alpha$ -SMA. No obstante, a *posteriori*, se llevó a cabo la inmunocitoquímica de esta proteína en RMC 85/4 en cultivo, utilizando el mismo anticuerpo que se usó para el Western y un anticuerpo secundario marcado con Cy3. Como puede apreciarse en la figura, esta línea celular presenta una estructura perfectamente organizada de sus fibras de  $\alpha$ -SMA.



**Figura 3.4. Inmunocitoquímica de la  $\alpha$ -SMA en RMC 85/4.** Las células (10.000 céls /pocillo) fueron cultivadas en medio completo en portas de 8 pocillos. Posteriormente se procedió con la inmunocitoquímica, utilizando una dilución 1/500 del anticuerpo anti  $\alpha$ -SMA y una 1/500 del anticuerpo secundario (*goat antimouse* marcado con Cy3). Tras las incubaciones, los portas fueron analizados mediante microscopia de fluorescencia.



# Discusión



La importancia de las PGs renales en la cirrosis se estableció ya hace veinte años, gracias a numerosos trabajos en los que se observó que la síntesis renal de PGs en pacientes con cirrosis y ascitis se encontraba significativamente incrementada, comparada con la de pacientes con cirrosis compensada (sin ascitis) y sujetos normales (Arroyo *et al.*, 1983; Arroyo *et al.*, 1986; Dunn, 1984; Planas *et al.*, 1983). Se estableció entonces que en la cirrosis compensada este aumento se producía como respuesta homeostática para antagonizar la actividad exacerbada de los sistemas vasoconstrictores endógenos (SRAA, SNS y ADH). Esta explicación deriva de dos evidencias: en primer lugar, se había observado que en pacientes con cirrosis y ascitis, la inhibición aguda de PGs con AINEs (indometacina, ibuprofeno, naproxeno, sulindaco o aspirina), se asociaba a un descenso significativo en el volumen urinario, excreción urinaria de sodio, tasa de FG y el FPR (Arroyo *et al.*, 1983; Boyer *et al.*, 1979; Dunn, 1984; Mirouze *et al.*, 1983; Zipser *et al.*, 1979). Además, se observó que los pacientes con elevada actividad de renina plasmática y niveles aumentados de norepinefrina, eran particularmente sensibles a estos efectos adversos, y que en cambio, en los pacientes con cirrosis compensada (los cuales no mostraban actividad aumentada del SRAA ni del SNS) los AINEs no perjudicaban la función renal. En segundo lugar, la inhibición aguda de PGs con aspirina en pacientes con cirrosis, ascitis y niveles plasmáticos elevados de ADH se asociaba con una reducción significativa en la capacidad renal de excretar agua libre (Pérez Ayuso *et al.*, 1984). Además, las PGs son también importantes en la respuesta renal a los diuréticos, ya que la administración de aspirina, naproxeno, indometacina y sulindaco suprime el efecto hemodinámico renal y reduce la eficacia natriurética de la furosemida en pacientes con ascitis (Planas *et al.*, 1983).

Aunque el papel de las PGs en el mantenimiento de la función renal en la cirrosis estaba bien establecido, en el momento en que se realizó este proyecto de tesis doctoral se desconocía cuál era la isoforma de la COX responsable de la síntesis de PGs involucradas en la homeostasis renal en esta enfermedad. Se sabía que en condiciones normales, tanto COX-1 como COX-2 se expresaban constitutivamente en el riñón (Bosch-Marcé *et al.*, 1999; Harris *et al.*, 1994; Jensen y Kurtz, 1997; Khan *et al.*, 1998; O'Neill y Ford-Hutchinson, 1993; Vio *et al.*, 1997). En concreto, en ratas normales, la COX-1 se expresa principalmente en células del túbulo colector y de la vasculatura renal, y en un reducido número de células papilares intersticiales, mientras que la expresión de la COX-2 es consistentemente focal y limitada a la mácula densa del aparato yuxtaglomerular, células epi-

teliales de la rama gruesa ascendente del asa de Henle y células papilares intersticiales (Harris *et al.*, 1994; Jensen y Kurtz, 1997; Khan *et al.*, 1998; Vio *et al.*, 1997). En el primer trabajo de esta tesis doctoral se demuestra que COX-1 y COX-2 se encuentran también presentes en los riñones de ratas con cirrosis y ascitis. Además, mientras que la expresión de COX-1 no cambia, la de COX-2 se encuentra aumentada en los riñones de ratas cirróticas. Estos resultados son consistentes con el hecho de que la COX-2, pero no la COX-1, se regula de forma específica en cada tipo celular en situaciones en las que existe alteración en el volumen plasmático normal. De hecho, se ha reportado un aumento en la expresión de COX-2 en la zona de la mácula densa y perimácula densa de ratas y perros con depleción crónica de sal, y en la médula renal de ratas alimentadas con dietas con alto contenido en sal (Harris *et al.*, 1994; Jensen y Kurtz, 1997; Khan *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). Además, se ha detectado una expresión aumentada de COX-2 en la médula renal de ratas a las que se les ha privado de agua (Yang *et al.*, 1999). En conjunto, estos resultados sugieren que la sobreexpresión renal de COX-2 que se produce en la cirrosis posiblemente es consecuencia de los cambios de volumen que ocurren en la enfermedad hepática, aunque el mecanismo exacto por el cuál se produce se desconoce hasta el momento.

A pesar de que las ratas cirróticas mostraron inmunoreactividad aumentada para la proteína COX-2 en el área renal, parece ser que en estos animales la función renal dependía principalmente de las PGs derivadas de la COX-1. De hecho, en el *Estudio 1* del primer artículo de esta tesis doctoral, tras la administración de un inhibidor selectivo de la COX-1 (SC-560) a ratas cirróticas inducidas por CCl<sub>4</sub> se observó una inhibición significativa de la síntesis renal de PGE<sub>2</sub> concomitante con un marcado empeoramiento en la hemodinámica renal y el mantenimiento del sodio renal. En cambio, el inhibidor selectivo COX-2 (celecoxib), a pesar de reducir la excreción urinaria de PGE<sub>2</sub> a niveles equivalentes a los de SC-560, no comprometió la función renal en ratas cirróticas. McAdam y colaboradores (McAdam *et al.*, 1999) también encontraron resultados similares en sujetos sanos tratados con celecoxib y aquellos que recibieron ibuprofeno. En conjunto, todos estos hallazgos, sugieren que las PGs de la orina son producidas tanto por COX-1 como por COX-2, pero que sólo aquellas derivadas de COX-1 están involucradas en el mantenimiento de la función renal en la cirrosis. El significado fisiológico de las PGs derivadas de la COX-2, en cambio, no fue evaluado en este estudio, ni en situación patológica ni en condiciones normales.



Las PGs también están involucradas claramente en la respuesta natriurética renal a los diuréticos del asa (Katayama *et al.*, 1984). Los diuréticos del asa, como la furosemida, son los diuréticos más potentes de que se dispone en la actualidad. Estas drogas inhiben la reabsorción de sodio en la rama ascendente del asa de Henle, actuando sobre un sistema de cotransporte específico, el  $\text{Na}^+2\text{Cl}^- \text{K}^+$  carrier (Puschett, 1981). Los diuréticos del asa también aumentan la tasa de FG y el FPR y la producción renal de  $\text{PGE}_2$ , mientras que los AINEs pueden modular el efecto vasodilatador renal y la eficiencia natriurética de estas drogas (Katayama *et al.*, 1984). Los resultados obtenidos en el *Estudio 2* del primer trabajo que constituye esta tesis, demuestran que la respuesta a la furosemida en las ratas cirróticas depende principalmente de las PGs derivadas de la COX-1, y que la inhibición selectiva de la COX-2 preserva el transporte salino renal inducido por la furosemida en la cirrosis. Merece la pena destacar que en las ratas cirróticas los efectos de la inhibición selectiva de la COX-1 con SC-560 sobre el efecto diurético y natriurético inducido por furosemida fueron dosis dependiente. No obstante, y al contrario de lo reportado con anterioridad por Katayama y colaboradores (Katayama *et al.*, 1984), que observaron que la indometacina podía aumentar o inhibir el efecto natriurético de la furosemida dependiendo de la dosis utilizada, nosotros observamos que a dosis bajas (10 mg/kg), SC-560 no indujo cambios, mientras que a dosis más altas (20 y 30 mg/kg) inhibía de forma significativa la respuesta a la furosemida.

Las PGs también están involucradas en el transporte renal de agua, modulando las acciones tubulares de la ADH (Mattix, 2000). En concreto, la  $\text{PGE}_2$  inhibe el efecto hidrosmótico de la ADH, mientras que la inhibición de PGs con AINEs aumenta el efecto tubular de esta hormona (Hebert, 1990; Mattix, 2000). En nuestro estudio, ni SC-560 ni celecoxib modificaron el metabolismo renal del agua en ratas con cirrosis y ascitis. Estos resultados contrastan con los obtenidos previamente con ketorolaco, en los que se apreciaba que la administración de este compuesto provocaba un empeoramiento significativo de la capacidad de excretar agua libre en ratas cirróticas (Bosch-Marcé *et al.*, 1999). Dado que ketorolaco es un inhibidor COX-1/COX-2, estos hallazgos sugieren que la homeostasis renal del agua en la cirrosis es dependiente de las PGs derivadas de ambas isoformas. De esta manera, en los riñones de ratas cirróticas parece existir un mecanismo compensatorio que permite que, cuando sólo una isoforma está inhibida, el metabolismo del agua pueda ser mantenido por las PGs producidas por la otra isoforma.

Diferentes estudios clínicos controlados demostraron que los inhibidores selectivos de la COX-2 tenían la misma eficacia terapéutica, pero con una incidencia menor de úlceras gastrointestinales y erosiones, que los AINEs convencionales (Bombardier *et al.*, 2000; Emery *et al.*, 1999). En ensayos clínicos aleatorios controlados también se evaluaron los efectos sobre las PGs renales, función renal e incidencia de efectos renales adversos de los dos inhibidores selectivos de la COX-2 comercializados en el momento en el que se realizó este primer trabajo, celecoxib y rofecoxib. Mientras que en sujetos de edad avanzada, tras dos semanas de tratamiento, rofecoxib no produjo ninguna alteración en la tasa de FG, sí provocó una reducción en la excreción urinaria de sodio, similar a la producida por indometacina durante los primeros tres días de terapia (Catella-Lawson *et al.*, 1999). En cambio, en pacientes de edad avanzada con deterioro leve renal estabilizado con una dieta baja en sodio, rofecoxib produjo un descenso en la tasa de FG de una magnitud similar a la observada en sujetos tratados con indometacina, sin verse afectada la excreción urinaria de sodio (Swan *et al.*, 2000). En pacientes ancianos, también celecoxib, al igual que rofecoxib, no llegó a disminuir la tasa de FG, pero produjo reducciones transitorias en la excreción urinaria de sodio similares a las producidas con naproxeno (Whelton *et al.*, 2000). En un ensayo clínico con sujetos deplecionados de sal, celecoxib no sólo produjo retención de sodio sino que provocó un descenso en la tasa de FG dosis dependiente (Rossat *et al.*, 1999). Como puede deducirse de todos estos hallazgos, hasta el momento en que se desarrolló el presente trabajo permanecían sin caracterizarse correctamente los efectos renales adversos de los inhibidores selectivos de la COX-2. Dado que la correcta caracterización de estos efectos renales de los coxibs es particularmente relevante en circunstancias más susceptibles a desarrollarse fallo renal inducido por AINEs (como en la enfermedad hepática avanzada, fallo cardíaco congestivo y síndrome nefrótico), los resultados de este primer trabajo, en un modelo de cirrosis experimental, sentaban las bases para futuros estudios en humanos, en los que se investigara si los inhibidores selectivos de la COX-2 podían considerarse como la estrategia antiinflamatoria de elección en pacientes con enfermedad hepática crónica.

De hecho, nuestro grupo ha publicado el pasado año un estudio en el que se demostraba que la administración a corto plazo de celecoxib, al contrario que naproxeno, no empeoraba la función renal ni plaquetar, ni tampoco la respuesta a diuréticos en la cirrosis

descompensada (Clària *et al.*, 2005). No obstante, en este trabajo se comenta la necesidad de determinar la seguridad de esta droga en tratamientos a largo plazo en la cirrosis.

Es bien sabido que las propiedades farmacológicas de los inhibidores selectivos de la COX-2, y en particular de celecoxib, se basan en su capacidad de inhibir la síntesis de PGs derivadas de esta isoforma, pero, a raíz de diversos trabajos, se han puesto de manifiesto otras acciones adicionales. De hecho, en trabajos recientes se ha demostrado que estos compuestos regulan la unión de factores de transcripción, como por ejemplo NF- $\kappa$ B y AP-1 (Niederberger *et al.*, 2001), inhiben la fosforilación de la proteína kinasa B/Akt (Hsu *et al.*, 2000; Yamazaki *et al.*, 2002b), bloquean la actividad y la translocación nuclear de ERK2 (Jones *et al.*, 1999) e inducen apoptosis activando una nueva ruta mitocondrial (Jendrossek *et al.*, 2003). Además, nuestro grupo recientemente ha demostrado que los inhibidores selectivos de la COX-2 son capaces de modular genes inflamatorios como el CINC-1 (*cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1*), un miembro de la familia de la IL-8 (Planagumà *et al.*, 2002). Todos estos resultados ponen de manifiesto que todavía queda mucho por conocer del amplio espectro de propiedades de estos compuestos. En consecuencia, nos planteamos realizar un segundo estudio para determinar cuáles eran los mecanismos moleculares de celecoxib a nivel renal, desarrollando un proyecto *in vitro* en la línea de células mesangiales RMC 85/4, donada por el Dr. Michael Martin de la Universidad de Hannover. Las células mesangiales constituyen un modelo celular muy útil para explorar las acciones renales de celecoxib, ya que estos miofibroblastos son esenciales en el mantenimiento de la estructura y de la función glomerular e inmunológica del riñón, además de constituir la principal célula renal productora de mediadores vasoactivos y proinflamatorios, como los eicosanoides (Tisher y Madsen, 1991). A parte de estudiar los mecanismos moleculares de celecoxib, también quisimos explorar los efectos de la albúmina, componente proteico mayoritario en la sangre, con efectos biológicos muy importantes (Peters, Jr., 1985). La albúmina, entre otras funciones, actúa como proteína estabilizadora genérica, contribuyendo de forma principal en el mantenimiento de la presión osmótica y del pH sanguíneo, y protege a las células frente a posibles daños de diferente naturaleza (Fitzpatrick y Waynald, 1981; Guyton y Hall, 1997; Zoellner *et al.*, 1996). Además, se ha visto que la albúmina es capaz de unirse a diferentes ácidos grasos y también a AINEs, y se ha caracterizado su papel como elemento importante en la formación de eicosanoides en plaquetas y leucocitos (Benz *et al.*, 1997; Broekman *et al.*, 1989; Dadaian *et al.*, 1996; Dadaian y Westlund, 1999; Ek *et al.*, 1997). Según estas observaciones, y considerando

que los pacientes cirróticos podían requerir terapia antiinflamatoria mientras recibían albúmina (la cual se utiliza en la clínica como expansor plasmático para prevenir la disfunción circulatoria postparacentesis y para reducir la incidencia de fallo renal (Ginès *et al.*, 1996; Sort *et al.*, 1999)), nos planteamos si las acciones moleculares de celecoxib podían estar influenciadas por esta proteína.

Nuestros resultados demostraron que las células RMC 85/4 principalmente transforman el AA en metabolitos de la COX y 12-HETE. Aunque, por RT-PCR no fuimos capaces de detectar expresión de 5-LO en esta línea celular, en sus sobrenadantes encontramos cantidades muy pequeñas de cisteinil-LTs y LTB<sub>4</sub>. Estos hallazgos concuerdan con estudios previos en los que se describe actividad 5-LO en el glomérulo de rata (Ardaillou *et al.*, 1986). Debe tenerse en cuenta que nuestros resultados reflejan la formación de eicosanoides por células que no se dividen, ya que están creciendo en medio sin suero durante 24 horas. Por otro lado, también observamos que las células RMC 85/4 producen cantidades detectables del metabolito del AA, el 8-epi-PGF<sub>2α</sub> (8-isoprostano). Los isoprostanos son isómeros de las PGs que, al contrario de los productos enzimáticos de la COX, se forman *in situ* en el mismo dominio fosfolipídico por peroxidación mediada por radicales libres. De hecho, los isoprostanos son fiables marcadores específicos de peroxidación lipídica no enzimática (Morrow *et al.*, 1990). Debido a que se ha postulado que la COX-2 por sí sola es una fuente, no sólo de 8-isoprostano, sino también de radicales de oxígeno (Chenevard *et al.*, 2003; Pratico y FitzGerald, 1996), las acciones inhibitoras de celecoxib sobre estos eicosanoides pueden obedecer a una inhibición directa de la biosíntesis de 8-isoprostano dependiente de COX-2, a una reducción en el grado de estrés oxidativo, o a ambos mecanismos a la vez.

Uno de los principales hallazgos del segundo artículo de esta tesis doctoral fue que la albúmina modulaba la biosíntesis de eicosanoides, las acciones de celecoxib y la liberación de renina por las células RMC 85/4. De hecho, en estas células la albúmina inhibió de forma significativa los niveles de PGE<sub>2</sub> e incrementó marcadamente la formación de 12-HETE y de cisteinil-LTs. Estos cambios son consistentes con observaciones previas, en las que se demostraba que la albúmina dirigía al AA hacia la lipooxigenación (Broekman *et al.*, 1989). En nuestro estudio la albúmina también influye sobre las acciones de celecoxib. La albúmina es la proteína plasmática más abundante y, desde un punto de vista farmacológico, es importante destacar que se trata del principal transportador de ácidos grasos no

esterificados, así como de diferentes drogas y metabolitos. Existen numerosas evidencias de que la albúmina es capaz de unir AINEs e influir en sus propiedades farmacocinéticas (Colmenarejo *et al.*, 2001). Además, se sabe que celecoxib tiene la capacidad de unirse con facilidad a diferentes proteínas y principalmente a la albúmina (Davies *et al.*, 2000). Por tanto, aunque las incubaciones de dicho estudio las realizáramos en medio sin suero, y que las células se expusieran a celecoxib 20 minutos antes de añadir la albúmina, no podemos descartar la posibilidad de que los efectos observados sean secundarios a la unión de celecoxib a la albúmina. Estos hallazgos, junto con las observaciones de que la albúmina reduce la liberación de renina por las células RMC 85/4, refuerzan la noción de que la albúmina está provista de importantes propiedades biológicas.

Un hallazgo de interés fue el obtenido a partir de los ensayos de transactivación realizados en estas células, en el que se pudo demostrar que celecoxib activaba el PPAR $\gamma$ . Además, celecoxib no alteró las acciones estimuladoras de la 15d-PGJ<sub>2</sub>, la PG que resulta de la deshidratación de la PGD<sub>2</sub> que gracias a su anillo ciclopentenona actúa como ligando natural y potente activador del PPAR $\gamma$  (Forman *et al.*, 1995). Además, por el interés en nuestro estudio, merece la pena destacar que es bien conocido que el metabolismo de la PGD<sub>2</sub> para formar la 15d-PGJ<sub>2</sub> es catalizado *in vitro* por la albúmina (Fitzpatrick y Wynalda, 1983). En nuestro *reporter assay* diseñado en estas células la albúmina inhibía de forma significativa la inducción del PPAR $\gamma$  mediada por 15d-PGJ<sub>2</sub>, un efecto ya reportado anteriormente por el grupo de EC Person (Person *et al.*, 2001). No obstante, nuestros resultados difieren de aquellos reportados anteriormente por los grupos de Yamazaki y Kusunoki (Yamazaki *et al.*, 2002a, Kusunoki *et al.*, 2002), en los que no se producía activación transcripcional del PPAR $\gamma$  en los *luciferase reporter gene assay* en respuesta a celecoxib y NS-398. Se desconoce todavía si esta controversia se debe a diferencias en los tipos celulares o en la metodología utilizada.

Tal y como se muestra en el Anexo al artículo 2, las RMC 85/4 expresan de forma constitutiva el RNAm de los PPARs  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (ver apartado 3.1 de Resultados) demostrando que, al igual que los cultivos primarios de células mesangiales, en condiciones basales, esta línea celular establecida posee las tres isoformas de estos receptores nucleares (en ratas, -Nicholas *et al.*, 2001-, y en conejos, -Guan *et al.*, 2001-). Además, también demostramos que en estado basal nuestras células eran capaces de producir y liberar al medio 15d-PGJ<sub>2</sub>,

y que tanto la inhibición selectiva de la COX-2 mediante celecoxib como la de la COX-1 con SC-560 reducían de forma significativa la biosíntesis de 15d-PGJ<sub>2</sub> mediada por las células RMC 85/4 (ver apartado 3.2 de *Resultados*, Anexo al artículo 2). Sorprendentemente y tal y como se muestra también en el Anexo al artículo 2 (apartado 3.3 de resultados), los ensayos de transactivación realizados con el inhibidor selectivo de la COX-1, SC-560, demostraron que este compuesto inhibía significativamente la activación del PPAR $\gamma$ , efecto contrario al producido por celecoxib.

De forma global, el hallazgo de que celecoxib se une y activa al PPAR $\gamma$  es muy importante a la hora de entender los mecanismos moleculares de este inhibidor. Según esto, y de forma similar a algunos AINEs convencionales, en los que también se ha demostrado su unión al PPAR $\gamma$  (Jaradat *et al.*, 2001; Lehmann *et al.*, 1997; Yamazaki *et al.*, 2002a), las propiedades farmacológicas de celecoxib estarían mediadas, al menos en parte, por la activación de estos receptores nucleares.

Nuestros resultados son de interés clínico y pueden ser relevantes en enfermedades en las que se produce alteración en el volumen de sangre efectivo. En este sentido, nuestro trabajo es especialmente adecuado a la patogénesis de las complicaciones renales en pacientes con cirrosis hepática descompensada, en la que los efectos renales de los inhibidores selectivos de la COX-2 son todavía un tema en discusión. Por ejemplo, está bien establecido que la función renal en la cirrosis depende de un equilibrio crítico entre la actividad de los sistemas vasoconstrictores endógenos y la producción renal de PGs endógenas. Dado que celecoxib, además de inhibir las PGs, también reduce la formación de 8-isoprostano, TXB<sub>2</sub> y 12-HETE, los cuales son potentes vasoconstrictores renales (Ma *et al.*, 1991; Morrow *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1992; Zipser *et al.*, 1983), lo que en teoría cabría esperar de este coxib es que produjera menos efectos adversos renales que los AINEs convencionales. De hecho, y como ya se ha comentado anteriormente, nuestro grupo ha publicado recientemente los resultados de un ensayo clínico aleatorio doble ciego en pacientes con cirrosis y ascitis, en los que se demuestra que la administración de celecoxib no empeora la función renal ni la respuesta a diuréticos, comparado con el AINE naproxeno (Clària *et al.*, 2005). Por otro lado, la modulación de la expresión de la  $\alpha$ -SMA por celecoxib y albúmina amplía nuestros resultados hacia otros escenarios diferentes al de la cirrosis y la ascitis, en los cuales el empeoramiento de la función renal está ampliamente

determinado por una sobreexpresión de este marcador, que indica activación de las células mesangiales (Remuzzi y Bertani, 1998; Tisher y Madsen, 1991).

En resumen, los resultados *in vitro* reportados en este trabajo aportan evidencias sobre nuevos mecanismos de acción por los que celecoxib y albúmina ejercen sus efectos biológicos en células renales, y aportan información para futuras evaluaciones de estos compuestos *in vivo*.





# Conclusiones



A partir de los resultados de este proyecto de investigación se extraen las siguientes conclusiones:

1. Tanto COX-1 como COX-2 se expresan de forma constitutiva en el riñón de ratas controles; mientras que la expresión de COX-1 no se modifica al inducir el proceso cirrótico, COX-2 se encuentra sobreexpresada respecto a los controles en animales con cirrosis y ascitis.
2. COX-1 se inmunolocaliza en los túbulos colectores, vasculatura renal, y células papilares intersticiales, siendo su expresión particularmente intensa en los túbulos colectores papilares, y de baja a moderada en los túbulos colectores corticales. COX-2 sin embargo, se localiza en la mácula densa y en los túbulos colectores de la médula externa.
3. La administración de SC-560 y celecoxib a los animales cirróticos se asocia con un descenso en la  $U_{PGE_2V}$  del 48 y el 47%, respectivamente.
4. La administración i.v. del inhibidor selectivo de la COX-1, SC-560, a ratas con cirrosis y ascitis, produce un descenso significativo, rápido y progresivo, en  $V$ ,  $U_{NaV}$ , tasa de FG y FPR.
5. Por el contrario, y aunque a los 60 minutos tras la administración se produce un descenso significativo en el  $V$  que es rápidamente reestablecido a los 80 minutos, equiparándose con los valores del grupo placebo, los efectos renales asociados a la administración i.v. de celecoxib son similares a los producidos por placebo.
6. Celecoxib, a diferencia de SC-560, no afecta a la eficacia diurética y natriurética de la furosemida en estos animales. SC-560 en cambio, produce un descenso dosis dependiente de la respuesta a la furosemida, siendo significativo a dosis de 20 y 30 mg/kg.
7. Ni celecoxib, ni SC-560, ni placebo, modifican la capacidad renal de excretar agua libre en ratas cirróticas con ascitis.
8. La línea RMC 85/4 conserva el fenotipo mesangial (positivas para desmina y vimentina, y negativas para citokeratina y factor VIII).
9. En estado basal, las células RMC 85/4 expresan el RNAm de COX-1, COX-2, 12/15-LO, PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  y PPAR $\gamma$ , y liberan al medio PGE $_2$ , TXB $_2$ , 12-HETE, 8-epi-PGF $_{2\alpha}$ , cisteinil-LTs, LTB $_4$ , y 15d-PGJ $_2$ .

10. La incubación de las RMC 85/4 con celecoxib (3  $\mu$ M, durante 16h) reduce la producción de PGE<sub>2</sub> y 8-epi-PGF<sub>2</sub> de estas células, sin afectar a la síntesis de otros eicosanoides.
11. La albúmina, por sí sola, reduce significativamente la producción de PGE<sub>2</sub>, y aumenta la de 12-HETE y cisteinil-LTs en las RMC 85/4. Al incubar las RMC 85/4 con celecoxib en presencia de albúmina se reduce significativamente la producción de PGE<sub>2</sub> y TXB<sub>2</sub>, y también disminuye el aumento de 12-HETE inducido por la albúmina.
12. La albúmina, por sí sola o en combinación con celecoxib, reduce de forma significativa la liberación de renina por las RMC 85/4.
13. Celecoxib incrementa significativamente y de forma dosis-dependiente la actividad del PPAR $\gamma$ , y además no modifica el efecto agonista de la 15d-PGJ<sub>2</sub>. SC-560, en cambio, inhibe la actividad transcripcional del PPAR $\gamma$ , al igual que la albúmina, que además, anula el efecto activador de la 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre este receptor nuclear.
14. Tanto celecoxib como albúmina potencian el efecto inhibitorio de la 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre la expresión de  $\alpha$ -SMA en las células RMC 85/4.

De manera global, de los resultados de esta tesis doctoral se puede concluir que, en la cirrosis experimental, y en concreto en la cirrosis con ascitis, el mantenimiento de la función renal es dependiente de las PGs derivadas de la COX-1, y que el uso de celecoxib, un inhibidor selectivo de la COX-2, en estos animales, no compromete de forma significativa su función renal. Asimismo, se demuestran nuevos mecanismos de acción de celecoxib, aparte de la inhibición de la COX-2, que sugieren que este compuesto puede inducir menores efectos renales adversos que los AINEs convencionales, en patologías como la cirrosis descompensada, en las que las PGs renales son de una importancia crítica en el mantenimiento de la función renal dentro de los límites normales.

# **ANEXO 1: Material y Métodos**



En esta sección se explicarán sólo aquellas técnicas y protocolos utilizados, que no quedan bien detallados en los artículos que constituyen esta tesis doctoral.

Todos los estudios realizados en animales se llevaron a cabo de acuerdo con los criterios del Comité de Ética e Investigación del Hospital Clínic y de las leyes de la Comunidad Europea respecto al uso de animales de experimentación.

### **1.- Modelo de inducción a cirrosis:**

La cirrosis se indujo en ratas Wistar macho (Charles-River, Saint Aubin les Elseuf, Francia) que inicialmente pesaban 160-180 g, siguiendo el método de inhalación de CCl<sub>4</sub> en una cámara estanca, descrito por Clària y Jiménez (Clària y Jiménez, 1999). Los animales se mantuvieron en el animalario de la Universidad de Barcelona y fueron alimentados *ad libitum* con pienso estándar y agua destilada. Con el propósito de acortar el tiempo requerido para el desarrollo de cirrosis, durante todo el protocolo de inducción, y empezando ya una semana antes del inicio del tratamiento con CCl<sub>4</sub>, se les administró fenobarbital (0.3 g/l) en el agua de bebida. Este compuesto actúa como inductor de la actividad del citocromo P450 microsomal, potenciando la hepatotoxicidad del CCl<sub>4</sub>. En cada sesión de inhalación se incluyeron dentro de la cámara estanca (de 70x25x20 cm) entre cinco y siete animales, que recibieron el CCl<sub>4</sub> burbujeado con un flujo constante de 1 l/min. Según este protocolo, los animales se exponen al hepatotóxico dos veces en semana (normalmente lunes y viernes), empezando con 0.5 min de burbujeo de CCl<sub>4</sub>, seguido de 0.5 min dentro de la cámara cerrada pero sin burbujeo. A la cuarta sesión se aumenta la dosis a 1 min de burbujeo y 1 min sin burbujeo. Después de esto, cada tres sesiones se va aumentando la dosis en un 1 min hasta que se alcanzan los 5 min de burbujeo y 5 min sin burbujeo, manteniéndose esta dosis hasta el momento del estudio de los animales. Debido a que el CCl<sub>4</sub> tiene propiedades anestésicas, durante el proceso de inhalación deben controlarse a los animales para evitar que se colapsen. Por ello, es aconsejable que la cámara estanca esté construida con un material transparente como vidrio o metacrilato.

Según este protocolo, a la 6ª semana del proceso de inducción pueden desarrollarse fibrosis y cirrosis, manteniéndose estas lesiones de forma constante aún en la 10ª semana del protocolo. La ascitis normalmente se desarrolla después de la semana 10, aunque en

estados muy iniciales (en el 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> día de inhalación) pueden irse produciendo episodios transitorios de ascitis que desaparecen espontáneamente.

Todos los estudios *in vivo* que constituyen el primer trabajo de esta tesis, se llevaron a cabo en ratas con ascitis bien establecida, que se encontraban en la semana 12-14 del protocolo de inducción.

Tanto para las técnicas invasivas como para la obtención de las correspondientes muestras biológicas que se detallan a continuación, los animales fueron anestesiados mediante inyección i.m. de ketamina (50mg/kg).

## **2.- Determinaciones de parámetros bioquímicos:**

Los animales utilizados en los estudios 1 y 2 del primer trabajo que constituye esta tesis se prepararon de la misma forma: una vez anestesiado el animal, para la recogida de muestras de sangre y las determinaciones hemodinámicas, se le colocó un catéter PVC-50 en la arteria femoral izquierda conectado a un transductor altamente sensible y a un registrador multicanal (MX4P y MT4, Lectromed Ltd, Jersey, Channel Islands, Reino Unido) para el registro de la presión arterial media (MAP) y el gasto cardíaco (HR). Para la infusión de las diferentes sustancias utilizadas en los estudios (<sup>125</sup>I-Iotalamato, paraaminohipurato, furosemida e inhibidores de las ciclooxigenasas), se colocó un catéter PVC-100 de doble luz en la vena yugular derecha. Mediante un catéter PVC-50 colocado en la vejiga se procedió a la recogida de muestras de orina utilizadas en las determinaciones de volumen urinario, excreción urinaria de sodio y potasio, tasa de FG, FRP y excreción urinaria de PGE<sub>2</sub>. La determinación de los diferentes parámetros bioquímicos se explica detalladamente en la sección *Methods* del primer artículo de esta tesis doctoral.

## **3.- Obtención de muestras biológicas:**

### ***3.1- Obtención de muestras de tejido renal de rata.***

Con el animal anestesiado se procedió a la extracción de ambos riñones a través de una incisión abdominal. En una placa de petri estéril, se diseccionaron los riñones rápidamente con un bisturí y se fraccionaron en pequeñas porciones que se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su utilización. Para el caso particular de la inmunohistoquímica de la



COX-1 y COX-2 (véase primer artículo), una vez extraídos los riñones, se seccionaron vertical y longitudinalmente, y se sumergieron en el tampón comercial de fijación MBF (Strecks laboratorios, Omaha, NE, USA) durante 24 h a 4° C. Posteriormente, se transfirieron a una solución de etanol al 70%, y se procedió según el protocolo detallado en el artículo, colaborando activamente con la Dra. Alane T. Koki de Pharmacia Research and Development (St Louis, Missouri, USA).

### ***3.2- Obtención de sangre.***

Tras anestesiar al animal se le colocó un catéter PVC-50 en la arteria femoral izquierda para recoger las muestras de sangre y realizar las diferentes determinaciones hemodinámicas. En cada extracción se obtuvieron 0.5 ml de sangre.

### ***3.3- Obtención de orina.***

La metodología fue diferente según se midiera la función renal o el metabolismo del agua. Así, para los estudios de función renal, una vez anestesiado el animal, se le colocó un catéter PVC-50 en la vejiga para recoger las muestras de orina. Durante el estudio, en los diferentes grupos de animales, se obtuvieron muestras de 4 periodos de 20 min. En cambio, para evaluar el metabolismo renal del agua, las muestras de orina se recogieron directamente de las jaulas metabólicas en las que se mantuvieron los animales.

## **4.- Cultivos celulares:**

Ambas líneas celulares (COS7, utilizada para la puesta a punto de las técnicas de transactivación y Western Blot, y RMC 85/4, utilizada en el segundo artículo de esta tesis), crecen adheridas al plástico, en una atmósfera al 95% aire / 5% CO<sub>2</sub>, a 37° C y con humedad saturante. En función de su tasa de crecimiento se realizan 1-2 pases por semana cuando están próximas a la confluencia (80-85%). El protocolo de tripsinización es el siguiente:

- 4.1.- Precalear a 37° C la solución de tripsina 1x para agilizar el proceso.
- 4.2.- Lavar la placa con 10 ml de DPBS sin Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>.
- 4.3.- Añadir 1-2 ml de tripsina/EDTA 1x.
- 4.4.- Incubar a 37° C durante 2-3 min.
- 4.5.- Golpear enérgica pero cuidadosamente el canto de la placa para despegar las células.

- 4.6.- Comprobar en el microscopio.
- 4.7.- Inactivar la reacción de la tripsina mediante la adición de 10 ml de medio completo.
- 4.8.- Pipetear suavemente varias veces arriba y abajo para separar los agregados de células que puedan haberse formado.
- 4.9.- Centrifugar las células a 800 g 5 min para eliminar los restos de tripsina/EDTA del medio.
- 4.10.- Aspirar el sobrenadante.
- 4.11.- Resuspender en medio completo.
- 4.12.- Sembrar en 10 ml de medio completo.

- Medios de cultivo:

Cultivo de la línea celular RMC 85/4:

Medio RPMI 1640 suplementado con  
10% (v/v) suero bovino fetal inactivado (FCS)  
2 mM L-Glutamina  
50 UI/ml Penicilina / 50 µg/ml Estreptomicina

Cultivo de la línea celular COS 7:

Medio DMEM (con L-Glutamina) suplementado con  
10% (v/v) FCS  
100 UI/ml Penicilina / 100 µg/ml Estreptomicina

**5.- Caracterización por inmunocitoquímica de la línea celular RMC 85/4:**

Al trabajar con una línea celular establecida, y no con un cultivo primario de células mesangiales, en primer lugar quisimos asegurarnos de que esta línea mantenía los marcadores inmunocitoquímicos característicos de las células mesangiales. Para ello, una vez realizado el recuento de células de un cultivo confluyente de RMC 85/4, se seleccionó una muestra pequeña, de aproximadamente 100.000 células, que se sometió a *cytospin* (500 g, 10 min) sobre portas de vidrio. Las preparaciones celulares resultantes se fijaron durante 10 min en acetona fría (-20° C), se dejaron secar rápidamente a temperatura ambiente, y se

guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de la técnica de inmunocitoquímica por el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Clínic. Los marcadores utilizados fueron:

- Desmina: marcador característico de células musculares.
- Vimentina: marcador citoplasmático de células de origen mesenquimal.
- Citokeratina: marcador de células epiteliales.
- Factor VIII: marcador de células endoteliales.

En concreto, la inmunocitoquímica de la línea RMC 85/4 reveló la positividad para desmina y vimentina, y la negatividad de citokeratina y factor VIII, confirmándose, por tanto, el fenotipo mesangial de estas células.

#### **6.- Extracción de RNA:**

Cuando las células RMC 85/4 cultivadas en medio completo (composición especificada en el apartado 4 de esta sección) alcanzaron la confluencia, se incubaron durante 24h en medio sin suero. La extracción del RNA total se realizó con un kit comercial (TRIzol Reagent, Gibco), de acuerdo a las instrucciones del mismo. Tras valorar el RNA mediante un espectrofotómetro (Uvikon 922, Kontron Instruments) y calcular su concentración, se procedió a comprobar su integridad mediante electroforesis en un gel desnaturante para RNA, mediante la visualización de las bandas de ambos RNAs ribosómicos (18 y 28S) teñidas con bromuro de etidio. A continuación se detallan los reactivos y protocolo necesario para la electroforesis:

#### Reactivos:

- Tampón MOPS x1: 0.2M MOPS; 50mM acetato sódico; 10mM EDTA, pH:7.0. Filtrar, guardar a temperatura ambiente protegido de la luz.
- Azul de carga 10x: 160  $\mu\text{l}$  MOPS x10; 100  $\mu\text{l}$  glicerol; 1.8 ml agua; un poco de azul de bromofenol en polvo.
- Tampón desnaturante: 150  $\mu\text{l}$  MOPS x10; 240  $\mu\text{l}$  formaldehído 37%; 750  $\mu\text{l}$  formamida; 150  $\mu\text{l}$  azul de carga 10x.

- Tampón SSCx10: 1.5M de NaCl, 150 mM de citrato trisódico dihidratado. Ajustar a pH 7.0 con HCl.

Protocolo: (para un gel de 50 ml al 1% de agarosa)

- 6.1.- Mezclar en un *erlenmeyer* 0.6 g de agarosa y 37 ml de agua.
- 6.2.- Calentar en un microondas hasta que se disuelva la agarosa.
- 6.3.- Cuando deje de liberar vapor, añadir en campana 8 ml de formaldehído 37% y 5 ml de MOPSx10. Mezclar. Verter en el molde y colocar peine.
- 6.4.- Preparar las muestras de RNA: 6 µl de RNA (x µl de RNA + 6-x µl de agua) + 24 µl de tampón desnaturizante. Calentar 10 min a 65° C. Poner en hielo.
- 6.5.- Añadir a las muestras 1 µl de bromuro de etidio (1µg/µl).
- 6.6.- Poner el gel en una cubeta previamente lavada con RNAsaZAP (Ambion) y cubierto de tampón MOPSx1. Cargar las muestras en los pocillos.
- 6.7.- Realizar la electroforesis a unos 40V 1h. Ir controlando las bandas de los RNAs ribosómicos hasta que queden a la distancia deseada y comprobar que ambas bandas se aprecien de forma nítida y que la superior (ribosómico mayor) presente una intensidad y amplitud más grande que la inferior (ribosómico menor).

## 7.- RT-PCR:

Una vez comprobado el RNA, las muestras se retrotranscribieron (RT) y se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y utilizando los cebadores o *primers* específicos para cada uno de los genes, COX-1, COX-2, 5-LO, 12/15-LO, PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  (ver “Anexo al artículo 2” del apartado de Resultados) y GAPDH. Para un volumen de 20 µl de reacción de RT se utilizaron:

- 2.5 µg de RNA total
- 4 µl AMV RT 5x *Reaction Buffer* (#M515, Promega)
- 2 µl dNTPs 10mM
- 0.5 µl *RNAse Inhibitor* 40u/µl
- 1 µl Oligo dT<sub>15</sub> (500 µg/ml)
- 1.5 µl AMV *Reverse Transcriptase* (#M5101, Promega)
- x µl H<sub>2</sub>O libre de nucleasas

La reacción de retrotranscripción se produce durante 45 min a 42° C, tras lo cual debe inactivarse, incubando las muestras 5 min a 95° C. A continuación pueden guardarse las muestras a 4° C (o a -20° C si es por un tiempo), prosiguiendo con la realización de la PCR, según las condiciones siguientes:

**Tabla 3: Condiciones RT-PCR.** En todas las amplificaciones se utilizó el kit de amplificación Taq DNA Polymerase (#18038-026, Invitrogen).

Gen	Accession Number	Primers	Tamaño amplificado	Condiciones PCR
<b>COX-1</b>	NM_017043	S: 5'-gtcattccctgtgttactatcc-3' A: 5'-ctcccttcacgacagcaatcg-3'	465 pb	(96°C 30'', 60°C 1', 72°C 1')
<b>COX-2</b>	NM_017232	S: 5'-actgctcactttgttgagtcattc-3' A: 5'-tttgattagtactgtagggttaatg-3'	586 pb	(96°C 30'', 60°C 1', 72°C 1')
<b>5-LO</b>	NM_012822	S: 5'-tacattfacctcagcctcattg-3' A: 5'-gtccactcccttttcactatca-3'	468 pb	(94°C 30'', 58°C 1', 72°C 30'')
<b>12/15-LO</b>	NM_031010	S: 5'-attcaaagtggatgtgtcagga-3' A: 5'-tggatggctatgggcaagatt-3'	810 pb	(94°C 30'', 56°C 45'', 72°C 1')
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	NM_013196	S: 5'-tgctgtc ctccttgatgaac-3' A: 5'-tcagaggctccctgaacagtg-3'	495 pb	(94°C 30'', 55°C 30'', 72°C 1'')
<b>PPAR<math>\beta/\delta</math></b>	NM_013141	S: 5'-cgccaagtggggtcagtcac-3' A: 5'-cgccaccagcttctctct-3'	489 pb	(94°C 30'', 58°C 30'', 72°C 1'')
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	NM_013124	S: 5'-cctttaccacgggttgatttc-3' A: 5'-acctgatggcattgtgagac-3'	438 pb	(96°C 30'', 60°C 30'', 72°C 1'')
<b>GAPDH</b>	NM_017008	S: 5'-tcctcaagattgtcagcaa-3' A: 5'-agatccacaacggatacatt-3'	309 pb	(96°C 30'', 60°C 1', 72°C 1')

Tras la reacción de amplificación, se analizaron 20  $\mu$ l de cada muestra mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, donde se comprobó que el tamaño de las bandas se correspondía con el esperado.

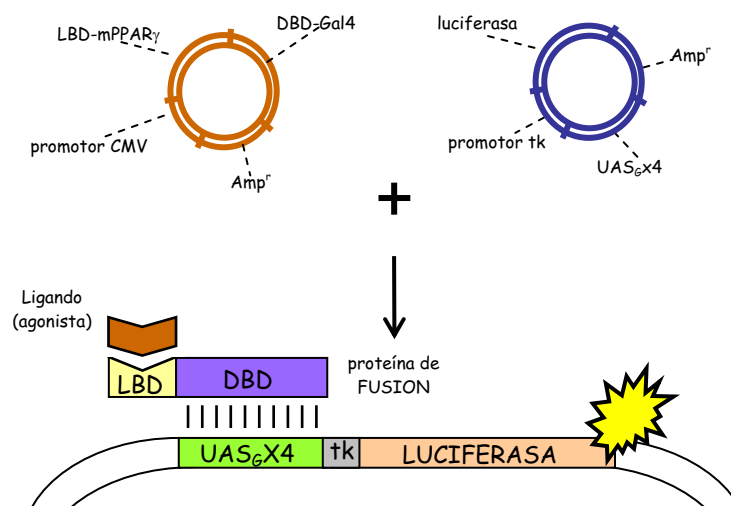
## 8.- Determinación de los niveles de eicosanoides y renina:

Después de realizar los tratamientos pertinentes en las células RMC 85/4, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos (entre 10-12 ml) y se congelaron a -20° C. Para cada una de las determinaciones (excepto para la de los niveles de isoprostanos) se evaporó 1 ml de los sobrenadantes mediante centrifugación en vacío (Speed-Vac, Savant). Una vez obtenido el extracto seco, se resuspendió en el tampón de EIA correspondiente y se procedió a realizar las diluciones pertinentes para poder determinar las concentraciones de cada metabolito mediante ELISA, de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Para el caso de los isoprostanos, previo a la evaporación de la muestra, ésta se sometió a un proceso de purificación mediante una columna de afinidad para el 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (Cayman), según el protocolo adjunto al producto.

### 9.- Ensayos de transactivación:

Para testar los efectos de celecoxib y albúmina sobre el PPAR $\gamma$ , co-transfectamos de forma transitoria a las RMC 85/4 con dos plásmidos: el primero (PPAR $\gamma$ -GAL4) expresaba una proteína de fusión formada por el dominio del PPAR $\gamma$  al que se le une el ligando, y por el dominio de unión al DNA de GAL4; el otro plásmido (tk-luc) expresa el gen de la luciferasa acoplado a una secuencia que es reconocida por GAL4. Además, se utilizó un plásmido que expresaba la proteína  $\beta$ -galactosidasa que se co-transfectó juntamente con los otros dos plásmidos y que se utilizó para normalizar los resultados (ver Figura 12).



**Figura 12. Representación de los plásmidos utilizados.** Esquema de los plásmidos facilitados por el Dr. Ronald Evans y utilizados en los experimentos de transfección de las líneas COS7 y RMC 85/4.

Los plásmidos PPAR $\gamma$ -GAL4 y tk-luc fueron donados desinteresadamente por el Dr. Ronald Evans de la Universidad de La Jolla (California). Primeramente se procedió a amplificar estos plásmidos en células competentes y se realizó una MAXIprep con ellos para poder disponer de elevadas cantidades de estos. A continuación se procedió a la transfección, realizándose ésta inicialmente en células COS7, y una vez puesta a punto la técni-

ca, se procedió en las células RMC 85/4. A continuación se detallan los protocolos de los diferentes pasos:

9.1.- *Preparación del medio LB:*

**MEDIO LB** ( 1 litro)

10 g triptona

5 g extracto de levadura

5 g NaCl

1 ml NaOH 1N

9.1.1a.- Colocar todos los componentes en una botella de vidrio, con un litro de agua, y autoclavar.

9.1.2a.- Una vez acabado el programa de autoclavado, cerrar la botella todavía dentro del autoclave para evitar contaminaciones.

9.1.3a.- Mantener a 4° C hasta su utilización, momento en el que debe añadirse 50 µg/ml de Ampicilina (stock: 50 mg/ml Amp).

En caso de preparar medio LB para placa:

9.1.1b.- Añadir 15 g/L Bactoagar a la mezcla anterior (no queda completamente disuelto)

9.1.2b.- Autoclavar.

9.1.3b.- Cuando el LB haya bajado de temperatura (que se pueda mantener en las manos) añadir 50 µg/ml Ampicilina (stock: 50 mg/ml Amp).

9.1.4.- Dispensar en placas de petri (alrededor del mechero Bunsen) y dejar solidificar 10-15 min.

9.1.5.- Mantener a 4° C hasta su utilización ¡¡BOCA ABAJO!! (las gotas de condensación quedan retenidas en la tapa de la placa y no sobre el agar).

9.2.- *Preparación de células competentes:*

9.2.1.- Inocular una sola colonia de células *E.coli* en 50 ml de medio LB, dejándola crecer toda la noche a 37° C en agitación.

9.2.2.- En una botella de 2 litros, inocular 4 ml del cultivo en 400 ml de medio LB, dejándolo crecer a 37° C en agitación hasta alcanzar un  $D.O_{.590}=0.375$  (crecimiento exponencial).

- 9.2.3.- Alicuotar el cultivo en ocho tubos estériles de polipropileno de 50 ml y dejar en hielo 5-10 min.
- 9.2.4.- Centrifugar las células a 1600 g durante 7 min a 4° C.
- 9.2.5.- Resuspender suavemente cada *pellet* en 10 ml de una solución fría de CaCl<sub>2</sub>.
- 9.2.6.- Centrifugar a 1100 g durante 5 min a 4° C.
- 9.2.7.- Resuspender de nuevo cada *pellet* en 10 ml de CaCl<sub>2</sub> frío y mantener en hielo 30 min.
- 9.2.8.- Centrifugar a 1100 g durante 5 min a 4° C.
- 9.2.9.- Resuspender cada *pellet* completamente en 2 ml de la solución de CaCl<sub>2</sub> y alicuotar 250 µl en tubos de polipropileno estériles.
- 9.2.10.- Congelar inmediatamente a -70° C.

9.3.- *Transformación de células competentes:*

- 9.3.1.- Colocar los tubos NUNC que necesitamos en hielo (uno por cada plásmido+1).
- 9.3.2.- Sacar las células competentes de -70° C y colocarlas en hielo.
- 9.3.3.- Mezclar las células suavemente (con el dedo, no vortear ya que su membrana está muy dañada).  
Colocar 90 µl de células en cada tubo NUNC.
- 9.3.4.- Añadir de 1-10 ng del plásmido (o menos) y mover con la pipeta dentro de la mezcla, cuidado con subir y bajar el líquido por la pipeta. Tapar.

**Nota :** *es importante hacer un CONTROL NEGATIVO de transformación; estas células no incorporarán ningún plásmido, y por tanto, no deben crecer en las placas con antibiótico.*

- 9.3.5.- Incubar en hielo 30 min.
- 9.4.6.- Someter a *heat shock* de 42° C (baño) durante 1.5 min ¡¡ sin moverlas!!
- 9.3.7.- Poner 2 min en hielo.
- 9.3.8.- Añadir 0.9 ml de LB (sin antibiótico).
- 9.3.9.- Dejarlas 45-60 min a 37° C agitando (en un incubador de bacterias) para que les de tiempo a expresar la resistencia antes de ponerlas en el medio con antibiótico).



- 9.3.10.- Esterilizar el asa de siembra con alcohol de 96° en el Bunsen. Colocar el asa dentro de la placa de petri, mientras abrimos los viales con las células-plásmido.
- 9.3.11.- Con una punta estéril, poner 100 µl de la mezcla en el centro de la placa.
- 9.3.12.- Repartir con el asa, moviendo ésta en una única dirección mientras hacemos girar la placa.
- 9.3.13.- Dejar la placa 10 min boca arriba.
- 9.3.14.- Dejar la placa toda la noche boca abajo a 37° C en el incubador.

#### 9.4.- Preparación de la MAXIprep:

- 9.4.1.- Poner de 15-20 ml de LB líquido en tubos de 50 ml (tantos como colonias queramos aislar).
- 9.4.2.- Picar con una punta estéril una sola colonia por placa, y dejarla dentro de su correspondiente tubo. Incubar a 37° C toda la noche en agitación. Guardar la placa en la nevera.
- 9.4.3.- Autoclavar botellas de 500 ml (1 por cada colonia aislada).
- 9.4.4.- A primera hora de la mañana, verter el cultivo de cada tubo en su correspondiente botella en la que habremos puesto el LB necesario para tener un volumen final de 100 ml.
- 9.4.5.- Dejar incubar a 37° C en agitación durante 5-6h más.
- 9.4.6.- Centrifugar a 6000g 15 minutos a 4° C.  
( a partir de ahora seguir el protocolo de *QIAfilter Plasmid Maxi Kit*)
- 9.4.7.- Una vez obtenidos los plásmidos, resuspenderlos en 100-200 µl de TE.
- 9.4.8.- Valoración del plásmido/-s: hacer una dilución 1/70 en TE y medir la  $A_{260}/A_{280}$ .
- 9.4.9.- Calcular los µg/µl de plásmido obtenidos, mediante la fórmula:

$$\boxed{A_{260} \times 50 \times 70 / 1000 = \mu\text{g} / \mu\text{l}}$$

#### 9.5.- Comprobación de los plásmidos:

Para ello debemos disponer del mapa de restricción completo de los plásmidos y saber qué tamaño presentan los constructos.

9.5.1.- Buscar las dianas de interés de cada plásmido, teniendo en cuenta que debemos realizar la electroforesis con ellos linearizados (como mínimo) y digeridos con enzimas que generen varios fragmentos.

9.5.2.- Ver qué enzimas debo utilizar, con qué Buffer y a qué temperatura son funcionales.

9.5.3.- Preparar (por cada digestión):

1 µg de plásmido (en un volumen de 2 µl aprox.)

1 µl de enzima

2.5 µl de Buffer (si es que está concentrado 10x)

hasta 25 µl con H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

9.5.4.- Incubar 2h a 37° C por ej. (normalmente es suficiente) e inactivar la reacción añadiendo 5 µl de azul de carga o bien calentando las reacciones a 65° C durante 10 min).

9.5.5.- Cargar en un gel al 1%:

0.5 g agarosa

1 ml TAE<sub>x50</sub>

hasta 50 ml con H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

3 µl de bromuro de etidio (al enfriarse la agarosa)

9.5.6.- Cargar 2 µl del marcador λHindIII : calentar previamente a 65° C 1 min, 2 µl del marcador, 9 µl de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> y 3 µl de azul de carga.

9.5.7.- Realizar la electroforesis.

9.5.8.- Una vez comprobado que nuestro plásmido es el de interés, lo alicuotamos en un stock de 100 ng/µl.

9.6.- *Transfección de células eucariotas:*

9.6.1.- Plaquear A ÚLTIMA HORA DE LA TARDE, 5.0x10<sup>4</sup> cels RMC 85/4 por pocillo en placas de 12-pocillos en medio completo (1.5x10<sup>4</sup> cels/pocillo si son COS7).

Dejar en el incubador toda la noche para que se adhieran.

9.6.2.- Transfectar las células A PRIMERA HORA DE LA MAÑANA (cuando las células han alcanzado el 70-80% de confluencia).

**Nota:** a partir de ahora hablaremos de diferentes condiciones de transfección: un tubo NUNC equivale a una condición de transfección, y como estos experimentos van a realizarse por duplicado, cada NUNC equivaldrá a dos pocillos.

9.6.3.- Hacer el diseño de la placa, teniendo en cuenta que el volumen final en cada NUNC deberá de ser de 150  $\mu$ l (75  $\mu$ l/pocillo). Los stocks de los que partimos son:

$\beta$ -Gal : 2 ng/ $\mu$ l (control de transfección)

PPAR $\gamma$ -GAL4 : 100 ng/ $\mu$ l (plásmido de expresión)

UAS<sub>G</sub>-tk-luc : 100 ng/ $\mu$ l (plásmido *reporter*)

**Nota :** mantener los reactivos en hielo durante el proceso.

9.6.4.- Preparar la mezcla de plásmidos: es aconsejable trabajar con volúmenes grandes para minimizar errores de pipeteo, por lo que en primer lugar debemos preparar una única MIX (o solución general) común para todas las condiciones, conteniendo las cantidades necesarias de los plásmidos *reporter* y  $\beta$ -Gal, ajustando a un volumen de 100  $\mu$ l/condición con *Buffer EC* (del Effectene Transfection Reagent kit, QIAGEN). A continuación se reparten 100  $\mu$ l de la MIX en cada uno de los NUNC, a los que añadiremos la cantidad de plásmido PPAR-GAL4 necesaria, y ajustándose a 150  $\mu$ l con *Buffer EC*.

9.6.5.- Añadir a cada NUNC (cada duplicado) 4.8  $\mu$ l de *Enhancer*. Incubar 3 min a temperatura ambiente.

9.6.6.- Añadir a cada NUNC (cada duplicado) la cantidad de *Effectene* necesaria, que se calcula multiplicando x 10 el número de  $\mu$ g de plásmido de ese tubo (sin tener en cuenta el  $\beta$ -Gal); una relación por tanto, de 1:10.

9.6.7.- Incubar 10 minutos a T<sup>a</sup> ambiente, durante los cuales lavamos las células con PBS y les ponemos 800  $\mu$ l de medio completo.

9.6.8.- Añadir 800  $\mu$ l de medio completo a la mezcla DNA-*Effectene*.

9.6.9.- Repartir 475  $\mu$ l/pocillo de la mezcla correspondiente, dejándolo caer gota a gota y repartiéndolo por todo el pocillo.

9.6.10.- Incubar a 37° C entre 40-64 h.

Para realizar las incubaciones con los agonistas, debe tenerse en cuenta que la actividad luciferasa es detectable desde las 24 a las 72h post-transfección.

*9.7.- Medida de la actividad luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa:*

*Nota: al principio ambos métodos son equivalentes.*

9.7.1.- Aspirar el medio de las células y lavar 2 veces con PBS (no es necesaria hacerlo bajo campana).

9.7.2.- Poner entre 100-200  $\mu$ l de *Buffer* de Lisis del ensayo de la luciferasa.

9.7.3.- Dejar en el *shaker* unos 15 min con una agitación intensa sin rotar.

9.7.4.- Rascar los pocillos con un *scraper* y recoger el lisado de cada pocillo en tubos *ependorf* separados.

9.7.5.- Centrifugar a 13000 rpm 5 min.

9.7.6.- Colocar 30  $\mu$ l del lisado en un tubo de 5 ml de plástico en el que se realizará la lectura de la luciferasa, y 30  $\mu$ l en un *ependorf* para valorar la  $\beta$ -galactosidasa.

*Determinación de la actividad luciferasa:*

9.7.7a.- Añadir al primer tubo con los 30  $\mu$ l de lisado, 100  $\mu$ l del sustrato de la luciferasa.

9.7.8a.- Leer inmediatamente en el luminómetro (programado con 3 segundos de tiempo de espera y 10 segundos de integración). Proceder con el resto de tubos.

*Determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa:*

9.7.7b.- Colocar 30  $\mu$ l del lisado en un tubo *ependorf*, que se incubará durante 45-60 min a 50° C para inactivar la actividad  $\beta$ -galactosidasa endógena.

*(En este punto puede pararse el protocolo guardando las muestras a 4° C).*

9.7.8b.- Trasferir 25  $\mu$ l del lisado inactivado a tubos de plástico de 5 ml. Añadir 50  $\mu$ l del *Substrate Reagent* (dilución 1:100 del sustrato con el *Assay Buffer*).

9.7.9b.- Incubar durante 45 min la mezcla, en un agitador orbital, protegiendo los tubos de la luz con papel de aluminio.

9.7.10b.- Añadir 25  $\mu$ l de *Initiation Solution* (dilución 1:6 *Enhancer* e *Initiation Reagent*) en el primer tubo.

9.7.11b.- Leer inmediatamente en el luminómetro (programado con 1 segundo de tiempo de espera y 5 segundos de integración). Proceder de la misma manera con el resto de tubos.

Los resultados se calculan dividiendo cada valor de la luciferasa por su correspondiente  $\beta$ -galactosidasa (datos normalizados), y posteriormente, todos los valores se hacen relativos al control, presentándolos por tanto como “número de veces de inducción con respecto al control” (*fold induction*).

#### **10.- Estadística:**

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el uso de la *t* Student desapareada. Se considera significativo a partir de una probabilidad de  $P \leq 0.05$ . Los datos aparecen en las tablas y figuras como la media  $\pm$  error estándar.



## **ANEXO 2: Publicaciones derivadas**





**Publicaciones derivadas de esta tesis doctoral.**

1. López-Parra M., Clària J., Planagumà A., Titos E., Masferrer J.L., Woerner B.M., Koki A.T., Jiménez W., Altuna R., Arroyo V., Rivera F. and Rodés J. *Cyclooxygenase-1 derived prostaglandins are involved in the maintenance of renal function in rats with cirrhosis and ascites*. British Journal of Pharmacology 2002;135:891-900.
2. López-Parra M., Clària J., Titos E., Planagumà A., Párrizas M., Masferrer J.L., Jiménez W., Arroyo V., Rivera F. and Rodés J. *The selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib modulates the formation of vasoconstrictor eicosanoids and activates PPAR $\gamma$ . Influence of albumin*. Journal of Hepatology 2005;42:75-81.
3. Clària J. and López-Parra M. *New perspectives in the modulation of the eicosanoid cascade in inflammation*. Letters in Drug Design & Discovery 2005;2(5):391-402.
4. López-Parra M., Clària J., Planagumà A., Titos E., Masferrer J.L., Woerner B.M., Koki A.T., Jiménez W., Arroyo V., Rivera F., Rodés J. *Renal effects of selective cyclooxygenase inhibition in experimental liver disease*. Advances in prostaglandin, leukotriene and other bioactive lipid research: Basic science and clinical applications. Kluwer Academic Publisher 2003;27:133-136.

**Publicaciones relacionadas con esta tesis doctoral.**

1. López-Parra M., Clària J., Telleria N., Titos E., Planagumà A., González-Pérez A., Arroyo V., Rodés J. *Gene expression profiling of renal dysfunction in rats with experimental cirrhosis*. Kidney International (en revisión).
2. Clària J., Kent J.D., López-Parra M., Escolar G., Ruiz-del-Árbol L., Ginès P., Jiménez W., Vucelic B., Arroyo V. *Effects of celecoxib and naproxen on renal function in nonazotemic patients with cirrhosis and ascites*. Hepatology 2005;41;579-587.



# Bibliografía



1. Abdelrahman M, Sivarajah A, and Thiemermann C. Beneficial effects of PPAR-gamma ligands in ischemia-reperfusion injury, inflammation and shock. *Cardiovasc Res*, **65**, 772-781 (2005).
2. Abramson SB. Inflammation in osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl*, **70**, 70-76 (2004).
3. Anderson GD, Hauser SD, McGarity KL, Bremer ME, Isakson PC, and Gregory SA. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J Clin Invest*, **97**, 2672-2679 (1996).
4. Anderson RJ, Berl T, McDonald KD, and Schrier RW. Evidence for an in vivo antagonism between vasopressin and prostaglandin in the mammalian kidney. *J Clin Invest*, **56**, 420-426 (1975).
5. Ando Y, Jacobson HR, and Breyer MD. Phorbol ester and A23187 have additive but mechanistically separate effects on vasopressin action in rabbit collecting tubule. *J Clin Invest*, **81**, 1578-1584 (1988).
6. Angeli P, Jiménez W, Arroyo V, Mackenzie HS, Zhang PL, Clària J, Rivera F, Brenner BM, and Rodés J. Renal effects of natriuretic peptide receptor blockade in cirrhotic rats with ascites. *Hepatology*, **20**, 948-954 (1994).
7. Appleby SB, Ristimaki A, Neilson K, Narko K, and Hla T. Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J*, **302**, 723-727 (1994).
8. Ardaillou R, Baud L, and Sraer J. Leukotrienes and other lipoxygenase products of arachidonic-acid synthesized in the kidney. *Am J Med*, **81**, 12-22 (1986).
9. Arroyo V, Clària J, Saló J, and Jiménez W. Antidiuretic-hormone and the pathogenesis of water-retention in cirrhosis with ascites. *Semin Liver Dis*, **14**, 44-58 (1994).
10. Arroyo V and Ginès P. Renal-function abnormalities in cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, **3**, 714-720 (1991).
11. Arroyo V, Ginès P, Jiménez W, and Rodés J. Pathophysiology of portal hypertension and its complication. In: Bircher J, Benhamou JP, McIntyre N, Rizzetto M, and Rodés J, eds. Oxford textbook of clinical hepatology. Oxford: Oxford University Press, chapter 8.2, 733-764 (1999a).
12. Arroyo V, Ginès P, Jiménez W, and Rodés J. Renal dysfunction in cirrhosis. In: Bircher J, Benhamou JP, McIntyre N, Rizzetto M, and Rodés J, eds. Oxford textbook of clinical hepatology. Oxford: Oxford University Press, (1999b).
13. Arroyo V, Ginès P, Rimola A, and Gaya J. Renal-function abnormalities, prostaglandins, and effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs in cirrhosis with ascites - an overview with emphasis on pathogenesis. *Am J Med*, **81**, 104-122 (1986).
14. Arroyo V, Planas R, Gaya J, Deulofeu R, Rimola A, Pérez Ayuso RM, Rivera F, and Rodés J. Sympathetic nervous activity, renin-angiotensin system and renal excretion of prostaglandin-E2 in cirrhosis - relationship to functional renal-failure and sodium and water-excretion. *Eur J Clin Invest*, **13**, 271-278 (1983).
15. Badr KF, Baylis C, Pfeffer JM, Pfeffer MA, Soberman RJ, Lewis RA, Austen KF, Corey EJ, and Brenner BM. Renal and systemic hemodynamic responses to intravenous infusion of leukotriene C4 in the rat. *Circ Res*, **54**, 492-499 (1984).
16. Badr KF, DeBoer DK, Schwartzberg M, and Serhan CN. Lipoxin A4 antagonizes cellular and in vivo actions of leukotriene D4 in rat glomerular mesangial cells: evidence for competition at a common receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 3438-3442 (1989).
17. Bazan NG, Colangelo V, and Lukiw WJ. Prostaglandins and other lipid mediators in Alzheimer's disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **68-9**, 197-210 (2002).
18. Bell-Parikh LC, Ide T, Lawson JA, McNamara P, Reilly M, and FitzGerald GA. Biosynthesis of 15-deoxy-delta12,14-PGJ2 and the ligation of PPARgamma. *J Clin Invest*, **112**, 945-955 (2003).
19. Bennett JS, Daugherty A, Herrington D, Greenland P, Roberts H, and Taubert KA. The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) - A science advisory from the American Heart Association. *Circulation*, **111**, 1713-1716 (2005).

20. Benz M, Werz O, Jacob R, and Steinhilber D. pH-dependent regulation of leukocyte 5-lipoxygenase activity in inflammatory exudates by albumin. *Inflamm Res*, **46**, 366-372 (1997).
21. Bergstrom S, Danielsson H, and Samuelsson B. The enzymatic formation of prostaglandin E2 from arachidonic acid prostaglandins and related factors. *Biochim Biophys Acta*, **90**, 207-210 (1964).
22. Berl T, Raz A, Wald H, Horowitz J, and Czaczkes W. Prostaglandin synthesis inhibition and the action of vasopressin: studies in man and rat. *Am J Physiol*, **232**, F529-F537 (1977).
23. Bernardi M, Trevisani F, Gasbarrini A, and Gasbarrini G. Hepatorenal disorders - role of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Semin Liver Dis*, **14**, 23-34 (1994).
24. Blendis L and Wong F. The hyperdynamic circulation in cirrhosis: an overview. *Pharmacol Ther*, **89**, 221-231 (2001).
25. Bley KR, Hunter JC, Eglen RM, and Smith JA. The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. *Trends Pharmacol Sci*, **19**, 141-147 (1998).
26. Boeglin WE, Kim RB, and Brash AR. A 12R-lipoxygenase in human skin: mechanistic evidence, molecular cloning, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 6744-6749 (1998).
27. Bolger PM, Eisner GM, Ramwell PW, and Slotkoff LM. Renal actions of prostacyclin. *Nature*, **271**, 467-469 (1978).
28. Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK, Schnitzer TJ, and Weaver A. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, **343**, 1520-1528 (2000).
29. Bonvalet JP, Pradelles P, and Farman N. Segmental synthesis and actions of prostaglandins along the nephron. *Am J Physiol*, **253**, F377-F387 (1987).
30. Bosch J, Abraldes JG, and Groszmann R. Current management of portal hypertension. *J Hepatol*, **38**, S54-S68 (2003).
31. Bosch J and García-Pagán JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol*, **32**, 141-156 (2000).
32. Bosch J and García-Pagán JC. Pathophysiology of portal hypertension and its complication. In: Bircher J, Benhamou JP, McIntyre N, Rizzetto M, and Rodés J, eds. Oxford textbook of clinical hepatology. Oxford: Oxford University Press, chapter 7.2, 661-669 (1999).
33. Bosch-Marcé M, Clària J, Titos E, Masferrer JL, Altuna R, Poo JL, Jiménez W, Arroyo V, Rivera F, and Rodés J. Selective inhibition of cyclooxygenase 2 spares renal function and prostaglandin synthesis in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology*, **116**, 1167-1175 (1999).
34. Botting RM. Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? *Clin Infect Dis*, **31** Suppl 5:S202-S210 (2000).
35. Boyer TD, Zia P, and Reynolds TB. Effect of indomethacin and prostaglandin-A1 on renal-function and plasma-renin activity in alcoholic liver-disease. *Gastroenterology*, **77**, 215-222 (1979).
36. Brash AR, Boeglin WE, and Chang MS. Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6148-6152 (1997).
37. Brater DC, Anderson SA, and Browncartwright D. Reversible acute decrease in renal-function by NSAIDs in cirrhosis. *Am J Med Sci*, **294**, 168-174 (1987).
38. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, Lines C, Riddell R, Morton D, Lanos A, Konstam MA, and Baron JA. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *New Engl J Med*, **352**, 1092-1102 (2005).
39. Broekman MJ, Eiroa AM, and Marcus AJ. Albumin redirects platelet eicosanoid metabolism toward 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid. *J Lipid Res*, **30**, 1925-1932 (1989).
40. Carter GW, Young PR, Albert DH, Bouska J, Dyer R, Bell RL, Summers JB, and Brooks DW. 5-lipoxygenase inhibitory activity of zileuton. *J Pharmacol Exp Ther*, **256**, 929-937 (1991).

41. Catella-Lawson F, McAdam B, Morrison BW, Kapoor S, Kujubu D, Antes L, Lasseter KC, Quan H, Gertz BJ, and FitzGerald GA. Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. *J Pharmacol Exp Ther*, **289**, 735-741 (1999).
42. Chabardes D, Brick-Ghannam C, Montegut M, and Siaume-Perez S. Effect of PGE2 and alpha-adrenergic agonists on AVP-dependent cAMP levels in rabbit and rat CCT. *Am J Physiol*, **255**, F43-F48 (1988).
43. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, and Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 13926-13931 (2002).
44. Chatterjee PK, Patel NS, Cuzzocrea S, Brown PA, Stewart KN, Mota-Filipe H, Britti D, Eberhardt W, Pfeilschifter J, and Thiemeermann C. The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 ameliorates ischemic acute renal failure. *Cardiovasc Res*, **61**, 630-643 (2004).
45. Chenevard R, Hurlimann D, Bechir M, Enseleit F, Spieker L, Hermann M, Riesen W, Gay S, Gay RE, Neidhart M, Michel B, Luscher TF, Noll G, and Ruschitzka F. Selective COX-2 inhibition improves endothelial function in coronary artery disease. *Circulation*, **107**, 405-409 (2003).
46. Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, and Staels B. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem*, **273**, 25573-25580 (1998).
47. Cipollone F and Patrono C. Cyclooxygenase-2 polymorphism: putting a brake on the inflammatory response to vascular injury? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **22**, 1516-1518 (2002).
48. Clària J. Cyclooxygenase-2 biology. *Curr Pharm Des*, **9**, 2177-2190 (2003).
49. Clària J and Jiménez W. Cirrosis hepática experimental y fisiopatología de la formación de ascitis en la enfermedad hepática crónica. *Gastroenterol Hepatol*, **15**, 171-182 (1992).
50. Clària J and Jiménez W. Renal dysfunction and ascites in carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats. In: Arroyo V, Ginès P, Rodés J, and Schrier RW, eds. Ascites and renal dysfunction in liver disease. Pathogenesis, diagnosis and treatment. Malden, MA, USA: Blackwell Science Inc, chapter 22, 379-396 (1999).
51. Clària J, Jiménez W, Ros J, Asbert M, Castro A, Arroyo V, Rivera F, and Rodés J. Pathogenesis of arterial-hypotension in cirrhotic rats with ascites - role of endogenous nitric-oxide. *Hepatology*, **15**, 343-349 (1992).
52. Clària J, Kent JD, López-Parra M, Escolar G, Ruiz-Del-Árbol L, Ginès P, Jiménez W, Vucelic B, and Arroyo V. Effects of celecoxib and naproxen on renal function in nonazotemic patients with cirrhosis and ascites. *Hepatology*, **41**, 579-587 (2005).
53. Clària J and López-Parra M. New perspectives in the modulation of the eicosanoid cascade in inflammation. *Letters in Drug Design & Discovery*, **2**, 391-402 (2005).
54. Clària J and Serhan CN. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 9475-9479 (1995).
55. Colmenarejo G, Alvarez-Pedraglio A, and Lavandera JL. Cheminformatic models to predict binding affinities to human serum albumin. *J Med Chem*, **44**, 4370-4378 (2001).
56. Criado M, Flores O, Hidalgo F, López-Novoa JM, and Sánchez-Rodríguez A. Interaction between prostanoids and nitric oxide in the control of tubular function in rats with chronic bile duct ligation. *Can J Physiol Pharmacol*, **77**, 111-117 (1999).
57. Cuzzocrea S, Ianaro A, Wayman NS, Mazzon E, Pisano B, Dugo L, Serraino I, Di Paola R, Chatterjee PK, Di Rosa M, Caputi AP, and Thiemeermann C. The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ2 attenuates the development of colon injury caused by dinitrobenzene sulphonic acid in the rat. *Br J Pharmacol*, **138**, 678-688 (2003).
58. Dadaian M, Granstrom E, and Westlund P. Albumin prevents metabolism of 12-hydroxyeicosatetraenoic acid by leukocytes in vitro. *Biochim Biophys Acta*, **1303**, 154-160 (1996).
59. Dadaian M and Westlund P. Albumin modifies the metabolism of hydroxyeicosatetraenoic acids via 12-lipoxygenase in human platelets. *J Lipid Res*, **40**, 940-947 (1999).

60. D'Amico G, Morabito A, Pagliaro L, and Marubini E. Survival and prognostic indicators in compensated and decompensated cirrhosis. *Dig Dis Sci*, **31**, 468-475 (1986).
61. Davies NM, McLachlan AJ, Day RO, and Williams KM. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib: a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor. *Clin Pharmacokinet*, **38**, 225-242 (2000).
62. De Marzo N, Sloane DL, Dicharry S, Highland E, and Sigal E. Cloning and expression of an airway epithelial 12-lipoxygenase. *Am J Physiol*, **262**, L198-L207 (1992).
63. Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J Biol Chem*, **269**, 13057-13060 (1994).
64. Desvergne B and Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*, **20**, 649-688 (1999).
65. Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vázquez M, Gonzalez FJ, and Wahli W. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature*, **384**, 39-43 (1996).
66. Devillier P, Baccard N, and Advenier C. Leukotrienes, leukotriene receptor antagonists and leukotriene synthesis inhibitors in asthma: an update. Part I: synthesis, receptors and role of leukotrienes in asthma. *Pharmacol Res*, **40**, 3-13 (1999).
67. DeWitt DL and Smith WL. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**, 1412-1416 (1988).
68. Dixon RA, Diehl RE, Opas E, Rands E, Vickers PJ, Evans JF, Gillard JW, and Miller DK. Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature*, **343**, 282-284 (1990).
69. Dogne JM, de L, X, Benoit P, Rolin S, Pirotte B, and Masereel B. Therapeutic potential of thromboxane inhibitors in asthma. *Expert Opin Investig Drugs*, **11**, 275-281 (2002).
70. Drazen JM, Israel E, and O'Byrne PM. Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *N Engl J Med*, **340**, 197-206 (1999).
71. DuBois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, and Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*, **12**, 1063-1073 (1998).
72. Dunn MJ. Role of eicosanoids in the control of renal-function in severe hepatic-disease. *Gastroenterology*, **87**, 1392-1395 (1984).
73. Edwards RM. Effects of prostaglandins on vasoconstrictor action in isolated renal arterioles. *Am J Physiol*, **248**, F779-F784 (1985).
74. Ek BA, Cistola DP, Hamilton JA, Kaduce TL, and Spector AA. Fatty acid binding proteins reduce 15-lipoxygenase-induced oxygenation of linoleic acid and arachidonic acid. *Biochim Biophys Acta*, **1346**, 75-85 (1997).
75. Emery P, Zeidler H, Kvien TK, Guslandi M, Naudin R, Stead H, Verburg KM, Isakson PC, Hubbard RC, and Geis GS. Celecoxib versus diclofenac in long-term management of rheumatoid arthritis: randomised double-blind comparison. *Lancet*, **354**, 2106-2111 (1999).
76. Erlinger S and Benhamou JP. Cirrhosis clinical aspects. In: Bircher J, Benhamou JP, McIntyre N, Rizzetto M, and Rodés J, eds. Oxford textbook of clinical hepatology. Oxford: Oxford University Press, chapter 6.2, 629-641 (1999).
77. Ermert L, Ermert M, Althoff A, Merkle M, Grimminger F, and Seeger W. Vasoregulatory prostanoid generation proceeds via cyclooxygenase-2 in noninflamed rat lungs. *J Pharmacol Exp Ther*, **286**, 1309-1314 (1998).
78. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, **240**, 889-895 (1988).
79. Evett GE, Xie W, Chipman JG, Robertson DL, and Simmons DL. Prostaglandin G/H synthase isoenzyme 2 expression in fibroblasts: regulation by dexamethasone, mitogens, and oncogenes. *Arch Biochem Biophys*, **306**, 169-177 (1993).
80. Farman N, Pradelles P, and Bonvalet JP. PGE2, PGF2 alpha, 6-keto-PGF1 alpha, and TxB2 synthesis along the rabbit nephron. *Am J Physiol*, **252**, F53-F59 (1987).



81. Ferreira SH, Moncada S, and Vane JR. Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. *Nat New Biol*, **231**, 237-239 (1971).
82. FitzGerald GA and Patrono C. Drug therapy: The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *New Engl J Med*, **345**, 433-442 (2001).
83. Fitzpatrick FA and Wainalda MA. Albumin-lipid interactions: prostaglandin stability as a probe for characterizing binding sites on vertebrate albumins. *Biochemistry*, **20**, 6129-6134 (1981).
84. Fitzpatrick FA and Wainalda MA. Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D<sub>2</sub>. Identification of products formed in vitro. *J Biol Chem*, **258**, 11713-11718 (1983).
85. Flower RJ and Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). *Nature*, **240**, 410-411 (1972).
86. Ford-Hutchinson AW, Gresser M, and Young RN. 5-Lipoxygenase. *Annu Rev Biochem*, **63**, 383-417 (1994).
87. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, and Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J<sub>2</sub> is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*, **83**, 803-812 (1995).
88. Fukunaga M, Makita N, Roberts LJ, Morrow JD, Takahashi K, and Badr KF. Evidence for the existence of F<sub>2</sub>-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, **264**, C1619-C1624 (1993).
89. Fukunaga M, Yura T, Grygorczyk R, and Badr KF. Evidence for the distinct nature of F<sub>2</sub>-isoprostane receptors from those of thromboxane A<sub>2</sub>. *Am J Physiol*, **272**, F477-F483 (1997).
90. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, **294**, 1871-1875 (2001).
91. Funk CD, Furci L, and FitzGerald GA. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human platelet/erythroleukemia cell 12-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 5638-5642 (1990).
92. Gao X, Porter AT, and Honn KV. Involvement of the multiple tumor suppressor genes and 12-lipoxygenase in human prostate cancer. Therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol*, **407**, 41-53 (1997).
93. Garavito RM and DeWitt DL. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim Biophys Acta*, **1441**, 278-287 (1999).
94. García-Estañ J, Atucha NM, Sabio JM, Vargas F, Quesada T, and Romero JC. Increased endothelium-dependent renal vasodilation in cirrhotic rats. *Am J Physiol*, **267**, R549-R553 (1994).
95. Gentilini P, Laffi G, Meacci E, Lavilla G, Cominelli F, Pinzani M, and Buzzelli G. Effects of oky-046, a thromboxane-synthase inhibitor, on renal-function in nonazotemic cirrhotic-patients with ascites. *Gastroenterology*, **94**, 1470-1477 (1988).
96. George J, Afek A, Shaish A, Levkovitz H, Bloom N, Cyrus T, Zhao L, Funk CD, Sigal E, and Harats D. 12/15-Lipoxygenase gene disruption attenuates atherogenesis in LDL receptor-deficient mice. *Circulation*, **104**, 1646-1650 (2001).
97. Giercksky KE. Mucosal protection by H<sub>2</sub>-antagonists against injury by non-steroidal anti-inflammatory agents. *Scand J Gastroenterol*, **24**, 32-35 (1989).
98. Gilroy DW, Colville-Nash PR, McMaster S, Sawatzky DA, Willoughby DA, and Lawrence T. Inducible cyclooxygenase-derived 15-deoxy(Delta)12-14PGJ<sub>2</sub> brings about acute inflammatory resolution in rat pleurisy by inducing neutrophil and macrophage apoptosis. *FASEB J*, **17**, 2269-2271 (2003).
99. Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, and Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med*, **5**, 698-701 (1999).
100. Gilroy DW, Lawrence T, Perretti M, and Rossi AG. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, **3**, 401-416 (2004).
101. Ginès A, Fernández-Esparrach G, Monescillo A, Vila C, Doménech E, Abecasis R, Angeli P, Ruiz-Del-Árbol L, Planas R, Solà R, Ginès P, Terg R, Inglada L, Vaqué P, Salerno F, Vargas V,

- Clemente G, Quer JC, Jiménez W, Arroyo V and Rodés J. Randomized trial comparing albumin, dextran 70, and polygeline in cirrhotic patients with ascites treated by paracentesis. *Gastroenterology*, **111**, 1002-1010 (1996).
102. Ginès A, Salmerón JM, Ginès P, Arroyo V, Jiménez W, Rivera F, and Rodés J. Oral misoprostol or intravenous prostaglandin-E2 do not improve renal-function in patients with cirrhosis and ascites with hyponatremia or renal-failure. *J Hepatol*, **17**, 220-226 (1993).
  103. Ginès P, Berl T, Bernardi M, Bichet DG, Hamon G, Jiménez W, Liard JF, Martin PY, and Schrier RW. Hyponatremia in cirrhosis: From pathogenesis to treatment. *Hepatology*, **28**, 851-864 (1998).
  104. Ginés P, Quintero E, Arroyo V, Terés J, Bruguera M, Rimola A, Caballería J, Rodés J, and Rozman C. Compensated cirrhosis - natural-history and prognostic factors. *Hepatology*, **7**, 122-128 (1987).
  105. Ginès P and Rodés J. Clinical disorders of renal function in cirrhosis with ascites. In: Arroyo V, Ginès P, Rodés J, and Schrier RW, eds. Ascites and renal dysfunction in liver disease. Pathogenesis, diagnosis and treatment. Malden, MA, USA: Blackwell Science Inc, chapter 3, 36-62 (1999).
  106. Goetzl EJ and Sun FF. Generation of unique mono-hydroxy-eicosatetraenoic acids from arachidonic acid by human neutrophils. *J Exp Med*, **150**, 406-411 (1979).
  107. Goldblatt MW. A depressor substance in seminal fluid. *J Soc Chem Ind*, **52**, 1056-1057 (1933).
  108. González-Núñez D, Clària J, Rivera F, and Poch E. Increased levels of 12(S)-HETE in patients with essential hypertension. *Hypertension*, **37**, 334-338 (2001).
  109. Govindarajan S, Nast CC, Smith WL, Koyle MA, Daskalopoulos G, and Zipser RD. Immunohistochemical distribution of renal prostaglandin endoperoxide synthase and prostacyclin synthase - diminished endoperoxide synthase in the hepatorenal-syndrome. *Hepatology*, **7**, 654-659 (1987).
  110. Guan Y, Zhang Y, Davis L, and Breyer MD. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in urinary tract of rabbits and humans. *Am J Physiol*, **273**, F1013-F1022 (1997).
  111. Guan Y, Zhang Y, Schneider A, Davis L, Breyer RM, and Breyer MD. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity is associated with renal microvasculature. *Am J Physiol Renal Physiol*, **281**, F1036-F1046 (2001).
  112. Guyton AC and Hall JE. Human physiology and mechanisms of disease. Philadelphia, PA, USA, WB Saunders Company (1997).
  113. Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, DuBois RN, and Breyer MD. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest*, **94**, 2504-2510 (1994).
  114. Hebert RL, Jacobson HR, and Breyer MD. PGE2 inhibits AVP-induced water flow in cortical collecting ducts by protein kinase C activation. *Am J Physiol*, **259**, F318-F325 (1990).
  115. Hecker M et al. The eicosanoids: Prostaglandins, Thromboxanes, Leukotrienes and related compounds. 290-304 (1995).
  116. Heise CE, O'Dowd BF, Figueroa DJ, Sawyer N, Nguyen T, Im DS, Stocco R, Bellefeuille JN, Abramovitz M, Cheng R, Williams DL, Jr., Zeng Z, Liu Q, Ma L, Clements MK, Coulombe N, Liu Y, Austin CP, George SR, O'Neill GP, Metters KM, Lynch KR, and Evans JF. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem*, **275**, 30531-30536 (2000).
  117. Helgadottir A, Manolescu A, Thorleifsson G, Gretarsdottir S, Jonsdottir H, Thorsteinsdottir U, Samani NJ, Gudmundsson G, Grant SF, Thorgeirsson G, Sveinbjornsdottir S, Valdimarsson EM, Matthiasson SE, Johannsson H, Gudmundsdottir O, Gurney ME, Sainz J, Thorhallsdottir M, Andresdottir M, Frigge ML, Topol EJ, Kong A, Gudnason V, Hakonarson H, Gulcher JR, and Stefansson K. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet*, **36**, 233-239 (2004).
  118. Hemler M and Lands WE. Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. *J Biol Chem*, **251**, 5575-5579 (1976).
  119. Henriksen JH and Ringlarsen H. Hepatorenal disorders - role of the sympathetic nervous-system. *Semin Liver Dis*, **14**, 35-43 (1994).

120. Herschman HR. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta*, **1299**, 125-140 (1996).
121. Hirata M, Hayashi Y, Ushikubi F, Yokota Y, Kageyama R, Nakanishi S, and Narumiya S. Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane-A<sub>2</sub> receptor. *Nature*, **349**, 617-620 (1991).
122. Hla T. Molecular characterization of the 5.2 KB isoform of the human cyclooxygenase-1 transcript. *Prostaglandins*, **51**, 81-85 (1996).
123. Hla T and Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**, 7384-7388 (1992).
124. Hoshiko S, Radmark O, and Samuelsson B. Characterization of the human 5-lipoxygenase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 9073-9077 (1990).
125. Hsu AL, Ching TT, Wang DS, Song X, Rangnekar VM, and Chen CS. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem*, **275**, 11397-11403 (2000).
126. Huber M, Kastner S, Scholmerich J, Gerok W, and Keppler D. Analysis of cysteinyl leukotrienes in human-urine - enhanced excretion in patients with liver-cirrhosis and hepatorenal-syndrome. *Eur J Clin Invest*, **19**, 53-60 (1989).
127. Imig JD. Eicosanoid regulation of the renal vasculature. *Am J Physiol Renal Physiol*, **279**, F965-F981 (2000).
128. Inoue H, Tanabe T, and Umesono K. Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma. *J Biol Chem*, **275**, 28028-28032 (2000).
129. Insel PA. The pharmacological basis of therapeutics. In: Goodman AG, Rall TW, Nies AS, and Taylor P, eds. Goodman and Gilman's. New York: Pergamon Press, chapter 638-681 (1990).
130. Iredale JP. Science, medicine, and the future - Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments. *Br Med J*, **327**, 143-147 (2003).
131. Irvine RF. How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *Biochem J*, **204**, 3-16 (1982).
132. Isshiki K, Haneda M, Koya D, Maeda S, Sugimoto T, and Kikkawa R. Thiazolidinedione compounds ameliorate glomerular dysfunction independent of their insulin-sensitizing action in diabetic rats. *Diabetes*, **49**, 1022-1032 (2000).
133. Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, and Samuelsson B. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 7220-7225 (1999).
134. Jaradat MS, Wongsud B, Phornchirasilp S, Rangwala SM, Shams G, Sutton M, Romstedt KJ, Noonan DJ, and Feller DR. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor isoforms and inhibition of prostaglandin H(2) synthases by ibuprofen, naproxen, and indomethacin. *Biochem Pharmacol*, **62**, 1587-1595 (2001).
135. Jarving R, Jarving I, Kurg R, Brash AR, and Samel N. On the evolutionary origin of cyclooxygenase (COX) isozymes: characterization of marine invertebrate COX genes points to independent duplication events in vertebrate and invertebrate lineages. *J Biol Chem*, **279**, 13624-13633 (2004).
136. Jendrossek V, Handrick R, and Belka C. Celecoxib activates a novel mitochondrial apoptosis signaling pathway. *FASEB J*, **17**, 1547-1549 (2003).
137. Jensen BL and Kurtz A. Differential regulation of renal cyclooxygenase mRNA by dietary salt intake. *Kidney Int*, **52**, 1242-1249 (1997).
138. Jiménez W, Clària J, Arroyo V, and Rodés J. Carbon-tetrachloride induced cirrhosis in rats - a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver-disease. *J Gastroenterol Hepatol*, **7**, 90-97 (1992).
139. Jiménez W, Martínez-Pardo A, Arroyo V, Bruix J, Rimola A, Gaya J, Rivera F, and Rodés J. Temporal relationship between hyper-aldosteronism, sodium retention and ascites formation in rats with experimental cirrhosis. *Hepatology*, **5**, 245-250 (1985).

140. Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, and Prescott SM. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem*, **268**, 9049-9054 (1993).
141. Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin E, Itani RM, Sarfeh IJ, and Tarnawski AS. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med*, **5**, 1418-1423 (1999).
142. Kargman S, Charleson S, Cartwright M, Frank J, Riendeau D, Mancini J, Evans J, and O'Neill G. Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology*, **111**, 445-454 (1996).
143. Katayama S, Attallah AA, Stahl RA, Bloch DL, and Lee JB. Mechanism of furosemide-induced natriuresis by direct stimulation of renal prostaglandin E<sub>2</sub>. *Am J Physiol*, **247**, F555-F561 (1984).
144. Kawahito Y, Kondo M, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Bishop-Bailey D, Inoue K, Kohno M, Yamada R, Hla T, and Sano H. 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ(2) induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J Clin Invest*, **106**, 189-197 (2000).
145. Khan AA, Brahim JS, Rowan JS, and Dionne RA. In vivo selectivity of a selective cyclooxygenase 2 inhibitor in the oral surgery model. *Clin Pharmacol Ther*, **72**, 44-49 (2002).
146. Khan KN, Venturini CM, Bunch RT, Brassard JA, Koki AT, Morris DL, Trump BF, Maziasz TJ, and Alden CL. Interspecies differences in renal localization of cyclooxygenase isoforms: implications in nonsteroidal antiinflammatory drug-related nephrotoxicity. *Toxicol Pathol*, **26**, 612-620 (1998).
147. Klein T, Reutter F, Schweer H, Seyberth HW, and Nusing RM. Generation of the isoprostane 8-epi-prostaglandin F<sub>2</sub>alpha in vitro and in vivo via the cyclooxygenases. *J Pharmacol Exp Ther*, **282**, 1658-1665 (1997).
148. Kliwer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, and Lehmann JM. A prostaglandin J<sub>2</sub> metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*, **83**, 813-819 (1995).
149. Knapp HR. Reduced allergen-induced nasal congestion and leukotriene synthesis with an orally active 5-lipoxygenase inhibitor. *N Engl J Med*, **323**, 1745-1748 (1990).
150. Komhoff M, Grone HJ, Klein T, Seyberth HW, and Nusing RM. Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. *Am J Physiol*, **272**, F460-F468 (1997).
151. Kozak KR, Rowlinson SW, and Marnett LJ. Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, **275**, 33744-33749 (2000).
152. Kuhn H and Thiele BJ. The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett*, **449**, 7-11 (1999).
153. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, and Herschman HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem*, **266**, 12866-12872 (1991).
154. Kusunoki N, Yamazaki R, and Kawai S. Induction of apoptosis in rheumatoid synovial fibroblasts by celecoxib, but not by other selective cyclooxygenase 2 inhibitors. *Arthritis Rheum*, **46**, 3159-3167 (2002).
155. Laffi G, Marra F, Carloni V, Azzena G, Defeo ML, Pinzani M, TostiGuerra C, and Gentilini P. Thromboxane-receptor blockade increases water diuresis in cirrhotic-patients with ascites. *Gastroenterology*, **103**, 1017-1021 (1992).
156. Lam BK and Frank AK. Leukotriene C<sub>4</sub> synthase. A pivotal enzyme in the biosynthesis of the cysteinyl leukotrienes. *Am J Respir Crit Care Med*, **161**, S16-S19 (2000).
157. Lanás A. Clinical experience with cyclooxygenase-2 inhibitors. *Rheumatology*, **41**, 16-22 (2002).
158. Lanás A, Panés J, and Piqué JM. Clinical implications of COX-1 and/or COX-2 inhibition for the distal gastrointestinal tract. *Curr Pharm Des*, **9**, 2253-2266 (2003).

159. Leehey DJ, Uckerman MT, and Rahman MA. Role of prostaglandins and thromboxane in the control of renal hemodynamics in experimental liver cirrhosis. *J Lab Clin Med*, **113**, 309-315 (1989).
160. Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, and Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem*, **272**, 3406-3410 (1997).
161. Lewis RA, Austen KF, and Soberman RJ. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med*, **323**, 645-655 (1990).
162. Llach J, Ginès P, Arroyo V, Salmerón JM, Ginès A, Jiménez W, Gaya J, Rivera F, and Rodés J. Effect of dipyridamole on kidney-function in cirrhosis. *Hepatology*, **17**, 59-64 (1993).
163. López-Novoa J, Navarro V, Rodicio J, and Hernando L. Cirrosis experimental de instauración rápida. Cronología de aparición de las lesiones hepáticas. *Patología*, **9**, 233-240 (1976).
164. López-Novoa JM, Rengel MA, and Hernando L. Dynamics of ascites formation in rats with experimental cirrhosis. *Am J Physiol*, **238**, F353-F357 (1980).
165. Loutzenhiser R, Epstein M, Horton C, and Sonke P. Reversal of renal and smooth muscle actions of the thromboxane mimetic U-44069 by diltiazem. *Am J Physiol*, **250**, F619-F626 (1986).
166. Lynch KR, O'Neill GP, Liu Q, Im DS, Sawyer N, Metters KM, Coulombe N, Abramovitz M, Figueroa DJ, Zeng Z, Connolly BM, Bai C, Austin CP, Chateauneuf A, Stocco R, Greig GM, Kargman S, Hooks SB, Hosfield E, Williams DL, Jr., Ford-Hutchinson AW, Caskey CT, and Evans JF. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature*, **399**, 789-793 (1999).
167. Ma YH, Harder DR, Clark JE, and Roman RJ. Effects of 12-HETE on isolated dog renal arcuate arteries. *Am J Physiol*, **261**, H451-H456 (1991).
168. Malmstrom K, Daniels S, Kotey P, Seidenberg BC, and Desjardins PJ. Comparison of rofecoxib and celecoxib, two cyclooxygenase-2 inhibitors, in postoperative dental pain: A randomized, placebo- and active-comparator-controlled clinical trial. *Clin Ther*, **21**, 1653-1663 (1999).
169. Mancini JA, Blood K, Guay J, Gordon R, Claveau D, Chan CC, and Riendeau D. Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin e synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis. *J Biol Chem*, **276**, 4469-4475 (2001).
170. Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC, and Seibert K. Selective-inhibition of inducible cyclooxygenase-2 in-vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad SciUSA*, **91**, 3228-3232 (1994).
171. Mattix HJ, Badr KF. Arachidonic acid metabolites and the kidney. In: Brenner BM and Rector FC, eds. *The Kidney*. Philadelphia: Saunders, chapter 756 (2000).
172. McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, and FitzGerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: The human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad SciUSA*, **96**, 272-277 (1999).
173. McLean EK, McLean AEM, and Sutton PM. Instant cirrhosis - an improved method for producing cirrhosis of liver in rats by simultaneous administration of carbon tetrachloride and phenobarbitone. *Br J Exp Pathol*, **50**, 502 (1969).
174. Meade EA, McIntyre TM, Zimmerman GA, and Prescott SM. Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem*, **274**, 8328-8334 (1999).
175. Mehrabian M, Allayee H, Wong J, Shi W, Wang XP, Shaposhnik Z, Funk CD, and Lusis AJ. Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice. *Circ Res*, **91**, 120-126 (2002).
176. Mene P, Simonson MS, and Dunn MJ. Physiology of the mesangial cell. *Physiol Rev*, **69**, 1347-1424 (1989).
177. Merlie JP, Fagan D, Mudd J, and Needleman P. Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J Biol Chem*, **263**, 3550-3553 (1988).

178. Michalik L, Desvergne B, and Wahli W. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer*, **4**, 61-70 (2004).
179. Milton AS. Thermoregulatory actions of eicosanoids in the central nervous system with particular regard to the pathogenesis of fever. *Ann N Y Acad Sci*, **559**, 392-410 (1989).
180. Mirouze D, Zipser RD, and Reynolds TB. Effect of inhibitors of prostaglandin synthesis on induced diuresis in cirrhosis. *Hepatology*, **3**, 50-55 (1983).
181. Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S, and Hayaishi O. Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J Biol Chem*, **251**, 2629-2636 (1976).
182. Moller S and Henriksen JH. The systemic circulation in cirrhosis. In: Arroyo V, Ginès P, Rodés J, and Schrier RW, eds. Ascites and renal dysfunction in liver disease. Pathogenesis, diagnosis and treatment: Blackwell Science Inc, (1999).
183. Moore K, Wendon J, Frazer M, Karani J, Williams R, and Badr K. Plasma endothelin immunoreactivity in liver-disease and the hepatorenal-syndrome. *New Engl J Med*, **327**, 1774-1778 (1992).
184. Moore KP, Taylor GW, Maltby NH, Siegers D, Fuller RW, Dollery CT, and Williams R. Increased production of cysteinyl leukotrienes in hepatorenal syndrome. *J Hepatol*, **11**, 263-271 (1990).
185. Moore KP, Wong F, Ginés P, Bernardi M, Ochs A, Salerno F, Angeli P, Porayko M, Moreau R, Garcia-Tsao G, Jiménez W, Planas R, and Arroyo V. The management of ascites in cirrhosis: report on the consensus conference of the International Ascites Club. *Hepatology*, **38**, 258-266 (2003).
186. Moras D and Gronemeyer H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 384-391 (1998).
187. Morita I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **68-69**, 165-175 (2002).
188. Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, and Roberts LJ. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**, 10721-10725 (1992a).
189. Morrow JD, Awad JA, Kato T, Takahashi K, Badr KF, Roberts LJ, and Burk RF. Formation of novel non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) in carbon tetrachloride hepatotoxicity. An animal model of lipid peroxidation. *J Clin Invest*, **90**, 2502-2507 (1992b).
190. Morrow JD, Harris TM, and Roberts LJ. Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal Biochem*, **184**, 1-10 (1990a).
191. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, and Roberts LJ. A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 9383-9387 (1990b).
192. Morrow JD, Moore KP, Awad JA, Ravenscraft MD, Marini G, Badr KF, Williams R, and Roberts LJ. Marked overproduction of non-cyclooxygenase derived prostanoids (F2-isoprostanes) in the hepatorenal syndrome. *J Lipid Mediat*, **6**, 417-420 (1993).
193. Murakami M and Kudo I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res*, **43**, 3-35 (2004).
194. Murphy RC. Prostaglandins in clinical practice. New York: Raven Press, 1-20 (1989).
195. Nadel JA, Conrad DJ, Ueki IF, Schuster A, and Sigal E. Immunocytochemical localization of arachidonate 15-lipoxygenase in erythrocytes, leukocytes, and airway cells. *J Clin Invest*, **87**, 1139-1145 (1991).
196. Narumiya S and FitzGerald GA. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest*, **108**, 25-30 (2001).
197. Natarajan R, Lanting L, Gonzales N, and Nadler J. Formation of an F2-isoprostane in vascular smooth muscle cells by elevated glucose and growth factors. *Am J Physiol*, **271**, H159-H165 (1996).
198. Nathan RA and Kemp JP. Efficacy of antileukotriene agents in asthma management. *Ann Allergy Asthma Immunol*, **86**, 9-17 (2001).

199. Newton R, Seybold J, Kuitert LM, Bergmann M, and Barnes PJ. Repression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 release by dexamethasone occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms involving loss of polyadenylated mRNA. *J Biol Chem*, **273**, 32312-32321 (1998).
200. Nicholas SB, Kawano Y, Wakino S, Collins AR, and Hsueh WA. Expression and function of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in mesangial cells. *Hypertension*, **37**, 722-727 (2001).
201. Niederberger E, Tegeder I, Vetter G, Schmidtko A, Schmidt H, Euchenhofer C, Brautigam L, Grosch S, and Geisslinger G. Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF-kappaB. *FASEB J*, **15**, 1622-1624 (2001).
202. Niederberger M, Ginès P, Martin PY, St John J, Woytaszek P, Xu LM, Tsai P, Nemenoff RA, and Schrier RW. Increased renal and vascular cytosolic phospholipase A(2) activity in rats with cirrhosis and ascites. *Hepatology*, **27**, 42-47 (1998).
203. Nigam S, Kumar GS, Sutherland M, Schewe T, Ikawa H, Yamasaki Y, Ueda N, and Yamamoto S. Metabolic suppression of platelet-type 12-lipoxygenase in human uterine cervix with invasive carcinoma. *Int J Cancer*, **82**, 827-831 (1999).
204. Nussmeier NA, Whelton AA, Brown MT, Langford RM, Hoefft A, Parlow JL, Boyce SW, and Verburg KM. Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery. *New Engl J Med*, **352**, 1081-1091 (2005).
205. Ohki S, Ogino N, Yamamoto S, and Hayaishi O. Prostaglandin hydroperoxidase, an integral part of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J Biol Chem*, **254**, 829-836 (1979).
206. O'Neill GP and Ford-Hutchinson AW. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett*, **330**, 156-160 (1993).
207. Otto JC, DeWitt DL, and Smith WL. N-glycosylation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 and their orientations in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **268**, 18234-18242 (1993).
208. Pairet M and Engelhardt G. Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. *Fundam Clin Pharmacol*, **10**, 1-17 (1996).
209. Papper S. The role of the kidney in laennec's cirrhosis of the liver. *Medicine*, **37**, 299-316 (1958).
210. Patrignani P, Tacconelli S, Sciulli MG, and Capone ML. New insights into COX-2 biology and inhibition. *Brain Res Rev*, **48**, 352-359 (2005).
211. Pérez Ayuso RM, Arroyo V, Camps J, Rimola A, Gaya J, Costa J, Rivera F, and Rodés J. Evidence that renal prostaglandins are involved in renal water metabolism in cirrhosis. *Kidney Int*, **26**, 72-80 (1984).
212. Person EC, Waite LL, Taylor RN, and Scanlan TS. Albumin regulates induction of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) by 15-deoxy-delta(12-14)-prostaglandin J(2) in vitro and may be an important regulator of PPARgamma function in vivo. *Endocrinology*, **142**, 551-556 (2001).
213. Peters-Golden M and Brock TG. 5-lipoxygenase and FLAP. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **69**, 99-109 (2003).
214. Peters T, Jr. Serum albumin155. *Adv Protein Chem*, **37**, 161-245 (1985).
215. Petrova TV, Akama KT, and Van Eldik LJ. Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: down-regulation of inducible nitric-oxide synthase by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 4668-4673 (1999).
216. Philip G, Malmstrom K, Hampel FC, Weinstein SF, LaForce CF, Ratner PH, Malice MP, and Reiss TF. Montelukast for treating seasonal allergic rhinitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial performed in the spring. *Clin Exp Allergy*, **32**, 1020-1028 (2002).
217. Pinzani M, Laffi G, Meacci E, Lavilla G, Cominelli F, and Gentilini P. Intrarenal thromboxane A2 generation reduces the furosemide-induced sodium and water diuresis in cirrhosis with ascites. *Gastroenterology*, **95**, 1081-1087 (1988).

218. Pinzani M, Milani S, DeFranco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A, TostiGuerra C, Maggi M, Failli P, Ruocco C, and Gentilini P. Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, **110**, 534-548 (1996).
219. Planagumà A, Titos E, López-Parra M, Gaya J, Pueyo G, Arroyo V, and Clària J. Aspirin (ASA) regulates 5-lipoxygenase activity and peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated CINC-1 release in rat liver cells: novel actions of lipoxin A4 (LXA4) and ASA-triggered 15-epi-LXA4. *FASEB J*, **16**, 1937-1939 (2002).
220. Planagumà A, Clària J, Miquel R, López-Parra M, Titos E, Masferrer JL, Arroyo V, and Rodés J. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 reduces liver fibrosis by mechanisms involving non-parenchymal cell apoptosis and PPARgamma activation. *FASEB J*, **19**, 1120-1122 (2005).
221. Planas R, Arroyo V, Rimola A, Pérez Ayuso RM, and Rodés J. Acetylsalicylic-acid suppresses the renal hemodynamic-effect and reduces the diuretic action of furosemide in cirrhosis with ascites. *Gastroenterology*, **84**, 247-252 (1983).
222. Pouliot M, McDonald PP, Krump E, Mancini JA, McColl SR, Weech PK, and Borgeat P. Colocalization of cytosolic phospholipase A2, 5-lipoxygenase, and 5-lipoxygenase-activating protein at the nuclear membrane of A23187-stimulated human neutrophils. *Eur J Biochem*, **238**, 250-258 (1996).
223. Powell WS. 15-Deoxy-delta12,14-PGJ2: endogenous PPARgamma ligand or minor eicosanoid degradation product? *J Clin Invest*, **112**, 828-830 (2003).
224. Pratico D and FitzGerald GA. Generation of 8-epiprostaglandin F2alpha by human monocytes. Discriminate production by reactive oxygen species and prostaglandin endoperoxide synthase-2. *J Biol Chem*, **271**, 8919-8924 (1996a).
225. Pratico D, Smyth EM, Violi F, and FitzGerald GA. Local amplification of platelet function by 8-Epi prostaglandin F2alpha is not mediated by thromboxane receptor isoforms. *J Biol Chem*, **271**, 14916-14924 (1996b).
226. Puschett JB. Sites and Mechanisms of Action of Diuretics in the Kidney. *J Clin Pharmacol*, **21**, 564-574 (1981).
227. Quintero E, Ginès P, Arroyo V, Rimola A, Camps J, Gaya J, Guevara A, Rodamilans M, and Rodés J. Sulindac reduces the urinary-excretion of prostaglandins and impairs renal-function in cirrhosis with ascites. *Nephron*, **42**, 298-303 (1986).
228. Quraishi O, Mancini JA, and Riendeau D. Inhibition of inducible prostaglandin E(2) synthase by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) and polyunsaturated fatty acids. *Biochem Pharmacol*, **63**, 1183-1189 (2002).
229. Radmark O. Arachidonate 5-lipoxygenase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **68-69**, 211-234 (2002).
230. Radmark O, Shimizu T, Jornvall H, and Samuelsson B. Leukotriene A4 hydrolase in human leukocytes. Purification and properties. *J Biol Chem*, **259**, 12339-12345 (1984).
231. Rahman M, Wright JT Jr., and Douglas JG. The role of the cytochrome P450-dependent metabolites of arachidonic acid in blood pressure regulation and renal function: a review. *Am J Hypertens*, **10**, 356-365 (1997).
232. Remuzzi G and Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *New Engl J Med*, **339**, 1448-1456 (1998).
233. Rimola A, Ginès P, Arroyo V, Camps J, Pérez Ayuso RM, Quintero E, Gaya J, Rivera F, and Rodés J. Urinary-excretion of 6-keto-prostaglandin F1-alpha, thromboxane B-2 and prostaglandin-E2 in cirrhosis with ascites - relationship to functional renal-failure (hepatorenal-syndrome). *J Hepatol*, **3**, 111-117 (1986).
234. Ristimaki A, Narko K, and Hla T. Down-regulation of cytokine-induced cyclo-oxygenase-2 transcript isoforms by dexamethasone: evidence for post-transcriptional regulation. *Biochem J*, **318**, 325-331 (1996).
235. Romano M and Clària J. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. *FASEB J*, **17**, 1986-1995 (2003).



236. Ros J, Clària J, Jiménez W, Bosch-Marcé M, Angeli P, Arroyo V, Rivera F, and Rodés J. Role of nitric oxide and prostacyclin in the control of renal perfusion in experimental cirrhosis. *Hepatology*, **22**, 915-920 (1995).
237. Rossat J, Maillard M, Nussberger J, Brunner HR, and Burnier M. Renal effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition in normotensive salt-depleted subjects. *Clin Pharmacol Ther*, **66**, 76-84 (1999).
238. Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, and Santoro MG. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature*, **403**, 103-108 (2000).
239. Rouzer CA, Matsumoto T, and Samuelsson B. Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A4 synthase activities. *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**, 857-861 (1986).
240. Sacerdoti D, Balazy M, Angeli P, Gatta A, and Mcgiff JC. Eicosanoid excretion in hepatic cirrhosis - Predominance of 20-HETE. *J Clin Invest*, **100**, 1264-1270 (1997).
241. Sakashita T, Takahashi Y, Kinoshita T, and Yoshimoto T. Essential involvement of 12-lipoxygenase in regiospecific and stereospecific oxidation of low density lipoprotein by macrophages. *Eur J Biochem*, **265**, 825-831 (1999).
242. Salahudeen A, Badr K, Morrow J, and Roberts J. Hydrogen peroxide induces 21-aminosteroid-inhibitable F2-isoprostane production and cytolysis in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*, **6**, 1300-1303 (1995).
243. Sametz W, Grobuschek T, Hammer-Kogler S, Juan H, and Wintersteiger R. Influence of isoprostanes on vasoconstrictor effects of noradrenaline and angiotensin II. *Eur J Pharmacol*, **378**, 47-55 (1999).
244. Samuelsson B. Isolation and identification of prostaglandins from human seminal plasma. Prostaglandins and related factors. *J Biol Chem*, **238**, 3229-3234 (1963).
245. Samuelsson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*, **220**, 568-575 (1983).
246. Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, and Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*, **237**, 1171-1176 (1987).
247. Scharschmidt LA and Dunn MJ. Prostaglandin synthesis by rat glomerular mesangial cells in culture. Effects of angiotensin II and arginine vasopressin. *J Clin Invest*, **71**, 1756-1764 (1983).
248. Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, and Baldwin AS, Jr. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*, **270**, 283-286 (1995).
249. Schlondorff D and Ardaillou R. Prostaglandins and other arachidonic acid metabolites in the kidney. *Kidney Int*, **29**, 108-119 (1986).
250. Schnackenberg CG and Wilcox CS. Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-Iso prostaglandin f2alpha. *Hypertension*, **33**, 424-428 (1999).
251. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, and Isakson P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 12013-12017 (1994).
252. Serhan CN, Haeggstrom JZ, and Leslie CC. Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. *FASEB J*, **10**, 1147-1158 (1996).
253. Shah V. Cellular and molecular basis of portal hypertension. *Clin Liver Disease*, **5**, 629-644 (2001).
254. Sigal E, Grunberger D, Highland E, Gross C, Dixon RA, and Craik CS. Expression of cloned human reticulocyte 15-lipoxygenase and immunological evidence that 15-lipoxygenases of different cell types are related. *J Biol Chem*, **265**, 5113-5120 (1990).
255. Simmons DL, Botting RM, and Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev*, **56**, 387-437 (2004).
256. Simon LS, Lanza FL, Lipsky PE, Hubbard RC, Talwalker S, Schwartz BD, Isakson PC, and Geis GS. Preliminary study of the safety and efficacy of SC-58635, a novel cyclooxygenase 2 inhibitor -

- Efficacy and safety in two placebo-controlled trials in osteoarthritis and rheumatoid arthritis, and studies of gastrointestinal and platelet effects. *Arthritis Rheum*, **41**, 1591-1602 (1998).
257. Simon LS, Weaver AL, Graham DY, Kivitz AJ, Lipsky PE, Hubbard RC, Isakson PC, Verburg KM, Yu SS, Zhao WW, and Geis GS. Anti-inflammatory and upper gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis - A randomized controlled trial. *JAMA*, **282**, 1921-1928 (1999).
258. Smith JB and Willis AL. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nat New Biol*, **231**, 235-237 (1971).
259. Smith WL and DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immunol*, **62**, 167-215 (1996).
260. Smith WL and Song I. The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **68-69**, 115-128 (2002).
261. Solà J, Camps J, Arroyo V, Guarner F, Gaya J, Rivera F, and Rodés J. Longitudinal-study of renal prostaglandin excretion in cirrhotic rats - relationship with the renin-aldosterone system. *Clinical Science*, **75**, 263-269 (1988).
262. Sort P, Navasa M, Arroyo V, Aldeguer X, Planas R, Ruiz-Del-Árbol L, Castells L, Vargas V, Soriano G, Guevara M, Ginès P, and Rodés J. Effect of intravenous albumin on renal impairment and mortality in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis. *N Engl J Med*, **341**, 403-409 (1999).
263. Spanbroek R, Grabner R, Lotzer K, Hildner M, Urbach A, Ruhling K, Moos MP, Kaiser B, Cohnert TU, Wahlers T, Zieske A, Plenz G, Robenek H, Salbach P, Kuhn H, Radmark O, Samuelsson B, and Habenicht AJ. Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 1238-1243 (2003).
264. Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer II, and Smith WL. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem*, **273**, 9886-9893 (1998).
265. Subbaramaiah K, Lin DT, Hart JC, and Dannenberg AJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem*, **276**, 12440-12448 (2001).
266. Swan SK, Rudy DW, Lasseter KC, Ryan CF, Buechel KL, Lambrecht LJ, Pinto MB, Dilzer SC, Obrda O, Sundblad KJ, Gumbs CP, Ebel DL, Quan H, Larson PJ, Schwartz JI, Musliner TA, Gertz BJ, Brater DC, and Yao SL. Effect of cyclooxygenase-2 inhibition on renal function in elderly persons receiving a low-salt diet. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*, **133**, 1-9 (2000).
267. Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert J, Morrow JD, Roberts LJ, Hoover RL, and Badr KF. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A2 receptors. *J Clin Invest*, **90**, 136-141 (1992).
268. Takahashi Y, Kawajiri H, Yoshimoto T, Hoshi N, and Higashida H. 12-Lipoxygenase overexpression in rodent NG108-15 cells enhances membrane excitability by inhibiting M-type K<sup>+</sup> channels. *J Physiol*, **521**, 567-574 (1999).
269. Tanabe T and Tohnai N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **68-69**, 95-114 (2002).
270. Tanikawa N, Ohmiya Y, Ohkubo H, Hashimoto K, Kangawa K, Kojima M, Ito S, and Watanabe K. Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem Biophys Res Commun*, **291**, 884-889 (2002).
271. Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, and Kudo I. Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem*, **275**, 32775-32782 (2000).
272. Thieringer R, Fenyk-Melody JE, Le Grand CB, Shelton BA, Detmers PA, Somers EP, Carbin L, Moller DE, Wright SD, and Berger J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma does not inhibit IL-6 or TNF-alpha responses of macrophages to lipopolysaccharide in vitro or in vivo. *J Immunol*, **164**, 1046-1054 (2000).

273. Thun MJ, Henley SJ, and Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst*, **94**, 252-266 (2002).
274. Tisher, CC and Madsen KM. Anatomy of the Kidney. In: Brenner BM and Rector FC, eds. The Kidney. Philadelphia, PA, USA, WB Saunders Company, chapter 1, 3-75 (1991).
275. Titos E, Clària J, Bataller R, Bosch-Marcé M, Ginès P, Jiménez W, Arroyo V, Rivera F, and Rodés J. Hepatocyte-derived cysteinyl leukotrienes modulate vascular tone in experimental cirrhosis. *Gastroenterology*, **119**, 794-805 (2000).
276. Titos E, Clària J, Planagumà A, López-Parra M, Villamor N, Párrizas M, Carrió A, Miquel R, Jiménez W, Arroyo V, Rivera F, and Rodés J. Inhibition of 5-lipoxygenase induces cell growth arrest and apoptosis in rat Kupffer cells: implications for liver fibrosis. *FASEB J*, **17**, 1745-1747 (2003).
277. Tsubouchi Y, Kawahito Y, Kohno M, Inoue K, Hla T, and Sano H. Feedback control of the arachidonate cascade in rheumatoid synoviocytes by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2. *Biochem Biophys Res Commun*, **283**, 750-755 (2001).
278. Uemura M, Buchholz U, Kojima H, Keppler A, Hafkemeyer P, Fukui H, Tsujii T, and Keppler D. Cysteinyl leukotrienes in the urine of patients with liver-diseases. *Hepatology*, **20**, 804-812 (1994).
279. Ulrich CM, Bigler J, Sibert J, Greene EA, Sparks R, Carlson CS, and Potter JD. Cyclooxygenase 1 (COX-1) polymorphisms in African-American and Caucasian populations. *Hum Mutat*, **20**, 409-410 (2002).
280. Urade Y and Eguchi N. Lipocalin-type and hematopoietic prostaglandin D synthases as a novel example of functional convergence. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **68-69**, 375-382 (2002).
281. Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y, Murata T, Matsuoka T, Kobayashi T, Hizaki H, Tuboi K, Katsuyama M, Ichikawa A, Tanaka T, Yoshida N, and Narumiya S. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature*, **395**, 281-284 (1998).
282. Vaamonde CA. Renal water handling in liver disease. In: Epstein M, ed. The kidney and liver disease. Philadelphia, PA, USA, Hanley and Belfus, chapter 2, 33-74 (1996).
283. Vaidya S, Somers EP, Wright SD, Detmers PA, and Bansal VS. 15-Deoxy-Delta12,1412,14-prostaglandin J2 inhibits the beta2 integrin-dependent oxidative burst: involvement of a mechanism distinct from peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligation. *J Immunol*, **163**, 6187-6192 (1999).
284. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, **231**, 232-235 (1971).
285. Vio CP, Cespedes C, Gallardo P, and Masferrer JL. Renal identification of cyclooxygenase-2 in a subset of thick ascending limb cells. *Hypertension*, **30**, 687-692 (1997).
286. Von Euler US. The specific blood pressure lowering substance in human prostate and seminal vesicle secretions. *Klin Wochenschr*, **14**, 1182-1183 (1935).
287. Vorobioff J, Bredfeldt JE, and Groszmann RJ. Increased blood-flow through the portal system in cirrhotic rats. *Gastroenterology*, **87**, 1120-1126 (1984).
288. Wang D, Wang M, Cheng Y, and Fitzgerald GA. Cardiovascular hazard and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Pharmacol*, **5**, 204-210 (2005).
289. Warner TD and Mitchell JA. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J*, **18**, 790-804 (2004).
290. Watanabe T, Medina JF, Haeggstrom JZ, Radmark O, and Samuelsson B. Molecular cloning of a 12-lipoxygenase cDNA from rat brain. *Eur J Biochem*, **212**, 605-612 (1993).
291. Werz O. 5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, **1**, 23-44 (2002).
292. Whelton A, Schulman G, Wallemark C, Drower EJ, Isakson PC, Verburg KM, and Geis GS. Effects of celecoxib and naproxen on renal function in the elderly. *Arch Intern Med*, **160**, 1465-1470 (2000).

293. Williams CS, Mann M, and DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*, **18**, 7908-7916 (1999).
294. Williams TJ and Peck MJ. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. *Nature*, **270**, 530-532 (1977).
295. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, and Henke BR. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem*, **43**, 527-550 (2000).
296. Woods JW, Evans JF, Ethier D, Scott S, Vickers PJ, Hearn L, Heibein JA, Charleson S, and Singer II. 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes. *J Exp Med*, **178**, 1935-1946 (1993).
297. Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, and Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 2692-2696 (1991).
298. Yamamoto T and Nozaki-Taguchi N. Analysis of the effects of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in spinal nociceptive transmission using indomethacin, a non-selective COX inhibitor, and NS-398, a COX-2 selective inhibitor. *Brain Res*, **739**, 104-110 (1996).
299. Yamazaki R, Kusunoki N, Matsuzaki T, Hashimoto S, and Kawai S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in association with activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in rheumatoid synovial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **302**, 18-25 (2002a).
300. Yamazaki R, Kusunoki N, Matsuzaki T, Hashimoto S, and Kawai S. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors show a differential ability to inhibit proliferation and induce apoptosis of colon adenocarcinoma cells. *FEBS Lett*, **531**, 278-284 (2002b).
301. Yang T, Michele DE, Park J, Smart AM, Lin Z, Brosius FC, III, Schnermann JB, and Briggs JP. Expression of peroxisomal proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the kidney. *Am J Physiol*, **277**, F966-F973 (1999a).
302. Yang T, Schnermann JB, and Briggs JP. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in renal medulla by tonicity in vivo and in vitro. *Am J Physiol*, **277**, F1-F9 (1999b).
303. Yang T, Singh I, Pham H, Sun D, Smart A, Schnermann JB, and Briggs JP. Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *Am J Physiol*, **274**, F481-F489 (1998).
304. Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takuwa Y, and Shimizu T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature*, **387**, 620-624 (1997).
305. Yokomizo T, Kato K, Terawaki K, Izumi T, and Shimizu T. A second leukotriene B(4) receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J Exp Med*, **192**, 421-432 (2000).
306. Yokoyama C and Tanabe T. Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*, **165**, 888-894 (1989).
307. Yura T, Fukunaga M, Khan R, Nassar GN, Badr KF, and Montero A. Free-radical-generated F-2-isoprostane stimulates cell proliferation and endothelin-1 expression on endothelial cells. *Kidney Int*, **56**, 471-478 (1999).
308. Zipser RD. Effects of selective inhibition of thromboxane synthesis on renal function in humans. *Am J Physiol*, **248**, F753-F756 (1985).
309. Zipser RD, Hoefs JC, Speckart PF, Zia PK, and Horton R. Prostaglandins: modulators of renal function and pressor resistance in chronic liver disease. *J Clin Endocrinol Metab*, **48**, 895-900 (1979).
310. Zipser RD, Radvan GH, Kronborg IJ, Duke R, and Little TE. Urinary thromboxane B2 and prostaglandin E2 in the hepatorenal syndrome: evidence for increased vasoconstrictor and decreased vasodilator factors. *Gastroenterology*, **84**, 697-703 (1983).
311. Zoellner H, Hofler M, Beckmann R, Hufnagl P, Vanyek E, Bielek E, Wojta J, Fabry A, Lockie S, and Binder BR. Serum albumin is a specific inhibitor of apoptosis in human endothelial cells 145. *J Cell Sci*, **109**, 2571-2580 (1996).

# Agradecimientos



...y llegamos al último apartado de esta tesis; la parte con el *impact factor* más elevado y que, a pesar del afecto con el que se escribe, no resulta sencilla su redacción: es difícil expresar en pocas palabras toda la gratitud que merecen aquéllos que me han ayudado a que por fin, alguien pueda leer estas líneas. Han sido 6 años (¡¡camino de 7 ya!!) trabajando en el Laboratorio de Hormonal, y son muchos los que me han ofrecido su ayuda incondicional, y también muchos los que, simplemente con un cariñoso saludo en el pasillo, me han hecho sobrellevar esos momentos de bajón que también han existido.

En primer lugar, quisiera agradecer al Dr. Joan Clària su dedicación, confianza y ayuda en todo momento. Gracias a su constancia y pasión inconmensurable por la investigación, mi estancia en su laboratorio ha dado lugar a mi formación profesional. Gracias Joan por brindarme la oportunidad de formar parte de tu grupo, un grupo cohesionado y en el que siempre has procurado el bienestar de todas nosotras (de momento, puedo utilizar el femenino...).

A la Dra. Francisca Rivera que, siendo responsable del Servicio de Hormonología del Hospital Clínic, nos permitió, tanto a mí como a otros muchos doctorandos, realizar la tesis doctoral en su Servicio.

Al Profesor Joan Rodés, Catedrático de Medicina de la UB, Director General del Hospital Clínic y tutor de esta tesis, por su apoyo a la investigación.

Al Dr. Vicente Arroyo, Catedrático de Medicina de la UB y Director de l'Institut de Malalties Digestives i Metabòliques del Hospital Clínic, por sus comentarios y críticas constructivas.

Al Dr. Wladimiro Jiménez, Cap Operatiu del Laboratori Clínic d'Especialitats del Centre de Diagnòstic Biomèdic (CDB) del Hospital Clínic, por su confianza, buenos consejos y el respeto que siempre me ha mostrado.

Al Dr. Josep Oriola, del CDB del Hospital Clínic por su ayuda y múltiples enseñanzas, especialmente en el laboratorio de Post-PCR.

A la Dra. Roser Casamitjana, del Laboratorio de Hormonal por sus ánimos y también por el servicio de locutorio gratuito...

A la Dra. Marcelina Párrizas (Marce) le debo, a parte de su amistad y las risas que nos hemos echado durante tantas tardes, innumerables consejos técnicos y su ayuda desinteresada en todo lo que le he pedido, que ha sido mucho (incluso para hacer la portada!!!). Muchas gracias por todo y ahora por fin podré conseguir una de tus tarjetas!! A ver cómo me dibujas ¿eh?.

Por supuesto que mis compañeras de la Unitat de DNA merecen una mención especial por todo lo que han significado: Carmen Escofet, Teresa Ferró, Montse Bernat, las doctoras Esther Titos, Natàlia Ferré y Anna Planagumà, las "bollycao" del grupo a las que quiero un montón y animo: Ana González y Raquel Horrrillo, y las que ya no están, la Dra. Marta Bosch y Mónica Borrajo. En particular, gracias a Montse por hacernos siempre de mami, infundiendo tanta paz y siendo siempre tan práctica. A ti Natàlia, agradecerte tu ayuda y tu entrega y darte ánimos y felicitarte también por el esfuerzo tan grande que estás realizando, y que estoy convencida que pronto será recompensado. Y por último a mi Esther (Titoos!!!) que me ha enseñado todo lo que sé y a la que le debo un sinfín de cosas, no sólo a nivel profesional sino

también personal. Gracias por tu disposición a echar una mano siempre, y por hacerme sentir tan querida, y recuerda que, sembrando como tú lo has hecho, el fruto no ha de tardar en llegar. ¡Os quiero a todas un montón!

A los integrantes del "Club Fiambrera", mis agradecimientos por todos esos días que hemos compartido, buenos, buenísimos y menos buenos también, pero siempre nuestros. Ahora físicamente somos menos que al principio, pero sólo físicamente!!!, Dani González (ahora en París), Mónica Bescós (ahora en Huesca), Cristina Mur (ahora buscando vida más allá del Clínic), Esther Titos (ahora en Tarragona), y las que aún permanecemos ahí, Melina, Montse, Natàlia, Pepa, Sylvia y una servidora.

En especial, quisiera dar las gracias a todos mis compañeros, muchos de ellos buenos amigos, con los que he ido creciendo profesionalmente y como persona. Han sido múltiples las experiencias compartidas: risas, lloros, éxitos, cabreos, cenas, resultados positivos, negativos también, confidencias, "embolados" múltiples y variados,... y serán también muchos y muy buenos los recuerdos que me lleve de estos años en el laboratorio. En primer lugar dar las gracias a Mónica Bescós, natural de Huesca, con la que he compartido mucho durante estos años y a la que le deseo la mejor de las suertes en el futuro; te quiero un montón y te echo de menos, Mca de Hu. A Melina Mara Musri (o Gata Flora), compañera y amiga incondicional, preocupada siempre de los demás, incluso a veces demasiado (empieza a pensar en ti!!), y a la que le deseo todo lo mejor en su vida porque se lo merece. A Sylvia Fernández Boj, capaz de rascar unos minutos de donde sea para echar una mano; Syl, recuerda que la vida es como un *brownie*: el primero puede no salir perfecto, pero te ayuda a aprender, para que luego el siguiente sea inmejorable. La Dra. Pepa Ros, una trabajadora nata con un gran corazón, a la que hay que darle un toque de vez en cuando para que se acuerde de que puede disfrutar de vacaciones!! A Cristina Mur, con la que he compartido risas y charlas y a la que animo a encontrar su camino, porque todo llega. A la Dra. Pilar Cejudo (Pili C), que a pesar de su porte frío es todo corazón; mucha suerte en San Diego y a por todas!! Al Dr. Daniel González (Dani "Glez") por su humor y simpatía y por su jerga tan peculiar que ha hecho historia en el Laboratorio (paso 4, "criticrín", "choquetines",...). A Guillermo Fernández, el paradigma de la tranquilidad y el optimismo ("yo, de mayor" quiero ser como tú...), y siempre dispuesto a escuchar y ayudar. A Leire Barquín (y a "toda su tropa"...), por su amistad y su entrega, y porque, no será en Bakio, pero parece que al final voy a leer,... A M<sup>a</sup> José Ramírez, la McGyver del Laboratorio, a la que le deseo lo mejor porque, a pesar de los titanes, lo ha conseguido: ánimo y a leer ya!!!. A Sergio Lario por sus amplios conocimientos y por ese sentido del humor tan exquisito, venga Sergio que esto hay que acabarlo!!!. A Blanca Guzmán, por sus conversaciones y sus chistes mejicanos, y a la que animo a que lea la tesis, aunque sea cambiando pañales, enhorabuena!!!. A "Cristinita de UTR", muchas gracias por sus consejos fisioterapéuticos y suerte en su nueva faceta profesional. A Sònia Tugués por su ayuda, especialmente en el congreso español (¿seguro que tu valeriana no llevaba "nada más"?). Gracias también a l@s compañer@s de Fibrosis Hepática, Pau Sancho, con el que me río un montón (hasta comiendo "foie" en Bilbao!) y que igual hasta lee antes que yo!!!, Raquel Cela, Montse, Jordi Colmenero, Helena, Cristina,... A la Dra. Montserrat Batlle por su empuje y su sentido del humor tan particular y a Esther "de cardio" por su siempre inagotable sonrisa. Al Dr. Manuel Morales, por su ayuda y buenos consejos. A la Dra. Loreto Boix, siempre dispuesta a escuchar y a dar ánimos, y por sus galletitas caseras!!!. A Cárol Armengol, la virtuosa del



Illustrator, ahora en París. Al Dr. Alberto Leivas, siempre tan dispuesto,... ¡¡¡ cachondeo!! Y en especial, mucho ánimo a los más jóvenes en el camino que están iniciando, Javi, Pedro, Anita, Raquel, Marc, Isa,... (alguno de ellos nació cuando yo estaba viendo a Naranjito!!). Quisiera mencionar también a los que ya no están en el laboratorio, como a la Dra. Patricia Fernández-Llama (compañera de laboratorio en su día y tribunal de esta tesis hoy!!!), a Judit (suerte en la Gran Manzana), Valeria, Eva García-Ramallo, Laia Fina, Beth, MarcoDomenicali (así, todo junto), Hans, Bernhard, Neus Görbig, y seguro que me dejo a muchísimos más que ruego y espero me disculpen.

Por supuesto que también quiero agradecer a todo el personal técnico del Servicio de Hormonal su ayuda, consejos y palabras de ánimo en todo momento. En especial, mil gracias a Lluïsa por tu humor y por tus enseñanzas y consejos, y a ti Marga, recuerda que soy Marta (ni Ana, ni Nuria, ni Raquel, ni Laia,...). Gracias a Nuri por la felicidad que irradia cada día, a Eulàlia por sus palabras de ánimo. A Leonor, la luchadora nata que de vez en cuando te da un toque "pa que" espabiles. Gracias también a Pili Pérez, (qué zapatos más chulos llevas!!), a Carmen Cano, a Cristina Ávia, Rosa Pagés, Montse Guillén, Pilar Pastor, Cristina Ferrán, Marina,... y espero no olvidarme de nadie. También quisiera agradecer a Espe y a Mercè su simpatía y su ayuda con el papeleo, y a Anna Beato, por todo lo que vale y por su sentido del humor. A las Sras. Ana y María y a Mercé y a Montse, además de darles las gracias por sus sonrisas y cuidados cada tarde, me gustaría pedirles disculpas por el desorden de mi poyata y por pisar el suelo mojado en tantísimas ocasiones. Y muchas gracias también a Rosalind y a Patrick, porque sus clases de inglés se han convertido muchas veces en terapias psicológicas, llenas de ánimo y voluntad de quitar hierro a los asuntos.

Quisiera agradecer también a aquéllos que me han ayudado en otros trabajos derivados de esta tesis. En particular, me gustaría destacar al Dr. Pedro Jares, de la Unitat de Genòmica del IDIBAPS, por su ayuda desinteresada con el *scaneo* de los *microarrays*, mostrándome después de 15 días de trabajo, la diferencia entre el *flagging* automático de Affymetrix y el manual de Axon!! y por brindarme su apoyo en mis primeros escarceos por el mundo laboral. Al Dr. Esteban Poch, Consultor de la Unidad de Nefrología del Hospital Clínic, su ayuda en la identificación de genes candidatos. A la Dra. Dolors Colomer, del Laboratorio de Hematopatología del Hospital Clínic, por su paciencia y ayuda con la *real-time PCR*. Al Dr. Ramón Bataller de la Unidad de Hepatología del Hospital Clínic, por dejarme utilizar el microscopio de fluorescencia, aunque mis ensayos de TUNEL no fueran demasiado brillantes. Quisiera hacer una mención especial a la Dra. Naiara Telleria, de la Unidad de Genómica Funcional de Dominion Pharmakine (Bilbao), por su ayuda incondicional a lo largo de este tiempo: al principio, en mis primeras aventuras con la *real-time PCR* (mas bien desventuras porque, ¿sabéis de alguien a quien, después de recibir una sonda TaqMan sin marcar, le envíen una nueva, con una base menos?), y posteriormente con el análisis de los *microarrays*. Quisiera agradecerle además toda la atención brindada durante mi estancia en su laboratorio, haciendo que esta se convirtiera en una experiencia inolvidable.

Gracias al personal del animalario de la Facultad de Medicina de la UB, ("Meri", Carmen, Blanca, Loli,...., Sergi y David), por procurar que nuestros animales se encontraran siempre en las mejores condiciones. También quisiera agradecer a mis compañeros de los laboratorios de Endocrinología, Genética, Toxicología y Bioquímica la ayuda recibida siempre

que lo he necesitado. Me gustaría hacer una mención especial a mis compañeros de la *Facultat de Girona*, Mireia, Eva, Ainhoa, Carmen, Toni y Ángel, con los que un día inicié esta carrera de Biología y una bonita amistad que todavía hoy mantenemos en la medida de lo posible.

Por último quisiera dedicar unas líneas a mi familia, ya que me han ayudado enormemente con su ánimo y su cariño a que esta tesis hoy pueda ser defendida. En especial quiero dar las gracias a mis padres Antonio y Maribel, por toda una vida de dedicación y amor incondicional a sus cuatro hijos, ayudándonos y respetando siempre nuestra vocación. Gracias por estar ahí siempre. A Carlos, por su cariño y su ayuda infinita, tanto en lo personal como en lo profesional, y por toda la paciencia de la que ha tenido que armarse durante estos años juntos; muchas gracias por haberme sabido levantar en tantas ocasiones. A mis hermanos Tony, Diana y Miguel Ángel por su cariño, complicidad y por tantas experiencias inolvidables vividas. A mis abuelos maternos "Parra" y Felisa, y a la memoria de mis abuelos paternos Antonio y Carmen, con todo mi cariño. A mis tíos y primos, Carmita, Toño, Julio y Carmen. A mis cuñados Iván, Marta, Óscar, Ana y Jessica y a mis suegros Paulino e Isabel. Y por último a mis sobrinos Cristina, Raúl y Álex a los que quiero con locura (y de los cuales ahora voy a poder disfrutar con mayor intensidad, ¡¡prepararos!!...) y síiii, ya sé... ahora empieza el proyecto "primito",... no me olvido !!!!

Para todos vosotros,

Gracias mil !!!





